

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Estado nutricional, metabolismo, inflamación y genética:**  
**un enfoque fisiopatológico integrado del progreso lesional en la infección crónica**  
**por el virus de la hepatitis C**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA**

**PRESENTADA POR**

**Beatriz Mateos Muñoz**

**Directores**

José María Ladero Quesada  
Enrique Rey Díaz-Rubio

**Madrid, 2015**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Medicina**



***Estado nutricional, metabolismo, inflamación y genética: un enfoque fisiopatológico integrado del progreso lesional en la infección crónica por el virus de la hepatitis C.***

Memoria para optar al Grado de Doctor presentada por

**Beatriz Mateos Muñoz**

Bajo la dirección de los doctores

Prof. José María Ladero Quesada

Prof. Enrique Rey Díaz-Rubio

Madrid, 2015



*A Camila y a mis tres Antonios*



## AGRADECIMIENTOS

*Es difícil agrupar en poco más de una página los nombres de todos aquellos que han hecho posible que este proyecto se lleve a cabo. En los siguientes párrafos trataré de conseguirlo bajo el riesgo de que alguno se quede en el tintero.*

*Mi más sincero y rotundo agradecimiento al Profesor José María Ladero, mi director y mentor. Ha sido un privilegio para mí poder trabajar mano a mano con él, aprender de sus conocimientos y escuchar cada uno de sus consejos. Merecen mi admiración, entre otras muchas cualidades, su capacidad de dedicación a la medicina y a la docencia.*

*Al Profesor Enrique Rey Díaz-Rubio por transmitirme su vocación investigadora y apoyarme en cada paso de este proyecto.*

*A la Dra. María José Devesa, por su fundamental colaboración en el reclutamiento de los pacientes y, por supuesto, por todo su apoyo en los últimos años.*

*Al Dr. Miguel Ángel Rubio, a la Dra. Pilar Matía y a Angélica Larrad del servicio de Endocrinología y Nutrición, por su ayuda en el diseño y realización del proyecto.*

*Una especial mención a la Dra. María José Torrejón, por su continua disponibilidad. A la Dra. Cárdenas, a la Dra. Maestro y a la Dra. Suárez por su imprescindible apoyo logístico.*

*Dentro de la Comunidad de Madrid, agradecer también la colaboración del servicio de Análisis Clínicos del Hospital Gómez Ulla y a Natalia por hacer de mediadora.*

*Pasando las fronteras provinciales, al Profesor José Agúndez por hacer siempre posible obtener resultados en el menor tiempo posible.*

*A Charo, Lourdes y Ana por su continuos avisos de la llegada de muestras. A Mercedes y Paola, por hacer más ameno el proceso de centrifugación.*

*A Blanca y a Sergio, que siempre han sido algo más que mis “Co-erres”. A todos y cada uno de los compañeros del Hospital Clínico San Carlos que me han hecho crecer personal y profesionalmente en estos años.*

*Por supuesto, a mi familia por su apoyo y ánimo incondicional, sin ellos no habría llegado hasta aquí y seguramente a ningún otro sitio. A mis amigos, médicos y no médicos, por comprender mi vocación y mi casi continua falta de tiempo.*

*Y en último lugar, y no por eso menos importante, al que ha tirado de mí cuando mis fuerzas han flaqueado y ha conseguido sacarme siempre una sonrisa incluso en mis días raros. Por tu constante motivación para hacerme mejor persona y conseguir que esta vida sea aún más bonita.*

# ÍNDICES





## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	XV
ÍNDICE DE TABLAS.....	XVII
RESUMEN.....	XXI
ABREVIATURAS.....	XXXI
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.- VIRUS DE LA HEPATITIS C.....	1
1.1.- <u>Virología</u> .....	1
1.1.1.- Estructura genómica.....	1
1.1.2.- Variabilidad genética.....	2
1.1.3.- Ciclo vital.....	3
1.2.- <u>Epidemiología</u> .....	4
1.3.- <u>Historia natural de la infección</u> .....	5
1.4.- <u>Diagnóstico virológico</u> .....	6
1.5.- <u>Papel de la IL28B en la HCC</u> .....	7
2.- ASPECTOS NUTRICIONALES DE LA HCC.....	8
2.1.- <u>Valoración nutricional mediante parámetros antropométricos</u> .....	9
2.2.- <u>Valoración nutricional mediante parámetros bioquímicos</u> .....	10
2.2.1.- Componentes plasmáticos: albúmina, prealbúmina y colesterol.....	10
2.2.2.- Oligoelementos.....	11
2.2.3.- Vitamina A y RBP4.....	12
2.2.4.- Vitamina D y su proteína transportadora. Gen <i>Gc</i> .....	14
3.- ASPECTOS INMUNOLÓGICOS E INFLAMATORIOS DE LA HCC.....	18
3.1.- <u>Respuesta inmune a la infección por VHC</u> .....	18
3.2.- <u>Proteína transportadora de polisacáridos y HCC</u> .....	19
3.3.- <u>Interleucina 6 y HCC</u> .....	20
4.- ESTEATOSIS HEPÁTICA EN LA HCC.....	21
4.1.- <u>Valoración de la esteatosis hepática</u> .....	22
4.2.- <u>Esteatosis hepática en la HCC</u> .....	23
4.3.- <u>Polimorfismo <i>PNPLA3</i> y HCC</u> .....	24

5.- RESISTENCIA A LA INSULINA EN LA HCC.....	25
5.1.- <u>Resistencia a la insulina</u> .....	25
5.2.- <u>Resistencia a la insulina e inflamación</u> .....	26
5.3.- <u>Resistencia a la insulina y cistatina C</u> .....	27
5.4.- <u>Valoración de la resistencia a la insulina</u> .....	28
5.5.- <u>Resistencia a la insulina en la HCC</u> .....	29
6.- FIBROSIS HEPÁTICA EN LA HCC.....	31
6.1.- <u>Fibrogénesis</u> .....	31
6.2.- <u>Valoración de la fibrosis hepática</u> .....	33
7.- NUTRICIÓN, METABOLISMO, GENÉTICA E INFLAMACIÓN: INFLUENCIA EN LA EVOLUCIÓN DE LA HCC.....	36
<b>II.- HIPÓTESIS</b> .....	<b>39</b>
<b>III.- OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>
<b>IV.- PACIENTES Y MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
1.- DISEÑO DEL ESTUDIO.....	49
1.1.- <u>Tipo y ámbito de estudio</u> .....	49
1.2.- <u>Descripción de la muestra a estudio</u> .....	49
2.- ESTUDIO BASAL.....	50
2.1.- <u>Datos demográficos y epidemiológicos</u> .....	51
2.2.- <u>Datos antropométricos</u> .....	51
2.3.- <u>Datos de laboratorio</u> .....	51
2.3.1.- Determinación de valores bioquímicos.....	53
2.3.2.- Determinación de valores de LBP e IL6.....	53
2.3.3.- Determinación de datos microbiológicos.....	53
2.3.4.- Determinación de polimorfismos genéticos.....	53
3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	55
3.1.- <u>Descripción de las variables cuantitativas</u> .....	55
3.2.- <u>Descripción de las variables cualitativas</u> .....	56
3.3.- <u>Análisis de datos</u> .....	57
<b>V.- RESULTADOS</b> .....	<b>59</b>
1.- ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA.....	61

1.1.- <u>Características clínico-epidemiológicas de la población estudiada</u> .....	61
1.1.1.- Aspectos socio-demográficos.....	61
1.1.2.- Aspectos epidemiológicos en relación con la infección de VHC.....	61
1.2.- <u>Características analíticas de la población estudiada</u> .....	62
1.3.- <u>Características antropométricas de la población estudiada</u> .....	64
1.4.- <u>Distribución de los polimorfismos genéticos estudiados</u> .....	65
1.4.1.- Polimorfismo <i>IL28B</i> .....	65
1.4.2.- Polimorfismos genéticos de la DBP.....	66
1.4.3.- Genotipos <i>PNPLA3</i> .....	66
2.- ANÁLISIS DE LOS ASPECTOS NUTRICIONALES DE LA HCC:.....	68
2.1.- <u>Análisis de composición corporal</u> .....	68
2.1.1.- Composición corporal e inflamación.....	68
2.2.2.- Composición corporal y estadio de la enfermedad.....	70
2.2.3.- Composición corporal y genotipos <i>IL28B</i> .....	70
2.2.4.- Composición corporal, presencia de esteatosis y genotipos <i>PNPLA3</i> .....	70
2.2.5.- Composición corporal y resistencia a la insulina.....	70
2.2.- <u>Análisis de parámetros bioquímicos nutricionales</u> .....	72
2.2.1.- Parámetros bioquímicos nutricionales e inflamación.....	72
2.2.2.- Parámetros bioquímicos nutricionales y estadio de la enfermedad.....	72
2.2.3.- Parámetros bioquímicos nutricionales y genotipos <i>IL28B</i> .....	73
2.2.4.- Parámetros bioquímicos nutricionales, esteatosis hepática y genotipo <i>PNPLA3</i> .....	74
2.2.5.- Parámetros bioquímicos nutricionales y resistencia a la insulina.....	74
2.3.- <u>Análisis de oligoelementos</u> .....	74
2.3.1.- Oligoelementos y otros parámetros bioquímicos.....	74
2.3.2.- Oligoelementos e inflamación.....	76
2.3.3.- Oligoelementos y estadio de la enfermedad.....	76
2.3.4.- Oligoelementos y genotipo <i>IL28B</i> .....	77
2.3.5.- Oligoelementos, esteatosis hepática y genotipo <i>PNPLA3</i> .....	78
2.3.6.- Oligoelementos y resistencia a la insulina.....	78
2.4.- <u>Análisis de vitamina A, RBP4 y cociente vitamina A/RBP4</u> .....	78

2.4.1.- Vitamina A, RBP4, cociente A/RBP4 y otros parámetros bioquímicos.....	79
2.4.2.- Vitamina A, RBP4, cociente A/RBP4 e inflamación.....	80
2.4.3.- Vitamina A, RBP4, cociente A/RBP4 y estadio de la enfermedad.....	80
2.4.4.- Vitamina A, RBP4, cociente A/RBP4 y polimorfismo <i>IL28B</i> .....	81
2.4.5.- Vitamina A, RBP4, cociente A/RBP4, EH y genotipo <i>PNPLA3</i> .....	81
2.4.6.- Vitamina A, RBP4, cociente A/RBP4 y resistencia a la insulina.....	81
2.4.7.- Deficiencia de vitamina A y RBP4. Relación con otras variables continuas..	82
2.5.- <u>Análisis de vitamina D</u> .....	83
2.5.1.- Vitamina D y parámetros bioquímicos.....	83
2.5.2.- Vitamina D e inflamación.....	83
2.5.3.- Vitamina D y estadio de la enfermedad.....	83
2.5.4.- Vitamina D y genotipo <i>IL28B</i> .....	84
2.5.5.- Vitamina D, esteatosis hepática y genotipo <i>PNPLA3</i> .....	84
2.5.6.- Vitamina D y resistencia a la insulina.....	84
2.5.7.- Insuficiencia y deficiencia de vitamina D. Relación con otras variables continuas.....	84
2.6.- <u>Análisis de los fenotipos de DBP</u> .....	85
2.6.1.- Fenotipo DBP y vitamina D.....	85
2.6.2.- Fenotipo DBP y parámetros bioquímicos.....	85
2.6.3.- Fenotipo DBP y composición corporal.....	85
2.6.4.- Fenotipo DBP y estadio de la enfermedad.....	86
2.6.5.- Fenotipo DBP y esteatosis hepática.....	86
2.6.6.- Fenotipo DBP y RI.....	86
3.- VALORACIÓN DEL ESTADO INFLAMATORIO SISTÉMICO.....	88
3.1.- <u>Marcadores séricos inespecíficos</u> .....	88
3.2.- <u>Análisis de LBP e IL6</u> .....	88
3.2.1.- LBP, IL6 y parámetros bioquímicos.....	88
3.2.2.- IL6, LBP y estadio de la enfermedad.....	89
3.2.3.- IL6, LBP y genotipo <i>IL28B</i> .....	90
3.2.4.- IL6, LBP, esteatosis hepática y genotipo <i>PNPLA3</i> .....	90
3.2.5.- IL6, LBP y resistencia a la insulina.....	91

4.- ANÁLISIS DE LA ESTEATOSIS HEPÁTICA EN LA HCC.....	93
4.1.- <u>Esteatosis hepática y parámetros bioquímicos</u> .....	93
4.2.- <u>Esteatosis hepática y estadio de la enfermedad</u> .....	93
4.3.- <u>Esteatosis hepática y genotipo <i>IL28B</i></u> .....	93
4.4.- <u>Esteatosis hepática y resistencia a la insulina</u> .....	93
4.5.- <u>Análisis del polimorfismo <i>PNPLA3</i></u> .....	94
4.5.1.- Genotipo <i>PNPLA3</i> y estadio de la enfermedad.....	94
4.5.2.- Genotipo <i>PNPLA3</i> y genotipo <i>IL28B</i> .....	95
4.5.3.- Genotipo <i>PNPLA3</i> y esteatosis hepática.....	95
4.5.4.- Genotipo <i>PNPLA3</i> y resistencia a la insulina.....	95
5.- ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA EN LA HCC.....	96
5.1.- <u>Resistencia a la insulina y parámetros bioquímicos</u> .....	96
5.2.- <u>Resistencia a la insulina y estadio de la enfermedad</u> .....	96
5.3.- <u>Análisis multivariado: Resistencia a la Insulina</u> .....	96
6.- ANÁLISIS DE LA FIBROSIS EN LA HCC.....	100
6.1.- <u>Fibrosis hepática y parámetros bioquímicos</u> .....	100
6.2.- <u>Análisis multivariado: Fibrosis hepática</u> .....	101
<b>VI.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>105</b>
1.- ASPECTOS NUTRICIONALES DE LA HCC.....	107
1.1.- <u>Parámetros antropométricos</u> .....	109
1.2.- <u>Parámetros bioquímicos nutricionales</u> .....	110
1.3.- <u>Oligoelementos</u> .....	111
1.4.- <u>Vitamina A, RBP4 y con vitamina A/RBP4</u> .....	114
1.5.- <u>Análisis de vitamina D</u> .....	116
1.6.- <u>Análisis de los fenotipos de DBP</u> .....	117
2.- ESTADO INFLAMATORIO SISTÉMICO EN LA HCC.....	120
2.1.- <u>LBP e IL6</u> .....	120
3.- ESTEATOSIS HEPÁTICA EN LA HCC.....	123
3.1.- <u>Esteatosis hepática y polimorfismo <i>PNPLA3</i></u> .....	123
4.- RESISTENCIA A LA INSULINA EN LA HCC.....	124

5.- FIBROSIS HEPÁTICA EN LA HCC.....	128
<b>VII.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>133</b>
<b>VIII.- APÉNDICES.....</b>	<b>137</b>
1.- APÉNDICE 1: Documento de Consentimiento Informado.....	139
2.- APÉNDICE 2: Informe de Comité Ético de Investigación Clínica.....	145
3.- APÉNDICE 3: Resultados no significativos.....	146
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>157</b>

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

### **INTRODUCCIÓN:**

FIGURA 1: Estructura genómica del VHC.....	2
FIGURA 2: Ciclo de vida del VHC.....	3
FIGURA 3: Distribución genómica de la infección por VHC.....	4
FIGURA 4: Metabolismo y funciones de la vitamina D.....	16
FIGURA 5: Relación patogénica entre obesidad, EH y RI.....	22
FIGURA 6: Mecanismo de EH por la mutación 148M de PNPLA3.....	24
FIGURA 7: Mecanismos moleculares que median en la resistencia a la insulina en la HCC.....	30
FIGURA 8: Proceso de fibrogénesis hepática.....	32
FIGURA 9: Valores de elastografía transitoria en HCC.....	35

### **RESULTADOS:**

FIGURA 10: Dispersión de LBP y % grasa (A), % muscular (B) y agua corporal total (C).....	69
FIGURA 11: Dispersión de IL6 e IMC (A), agua corporal total (B) y agua extracelular (C).....	69
FIGURA 12: Representación gráfica de las diferencias significativas en el componente grasa (A), muscular (B), agua corporal total (C) y agua extracelular (D), entre los pacientes con y sin resistencia a la insulina.....	71
FIGURA 13: Dispersión de IL6 y albúmina (A), colesterol (B) y prealbúmina (C).....	72
FIGURA 14: Gráficos de dispersión de LBP y Cu (A), IL6 y Se (B).....	76
FIGURA 15: Concentraciones de Se (A) y Zn (B) para los distintos estadios evolutivos de la HCC.....	77
FIGURA 16: Dispersión de IL6, vitamina A (A), RBP4 (B) y LBP con cociente A/RBP4 (C).....	80
FIGURA 17: Valores de vitamina A en los diferentes estadios de fibrosis hepática.....	81
FIGURA 18: Valores de HOMA (A) y de insulina (B) para los diferentes fenotipos de DBP.....	87
FIGURA 19: Valores de IL6 en los diferentes estadios de fibrosis hepática.....	90
FIGURA 20: Valores de LBP (A) e IL6 (B) en la resistencia a la insulina.....	91



FIGURA 21: Gráficos de dispersión de LBP, Insulina (A), HOMA (B), y de IL6 con insulina (C) y HOMA (D).....	92
FIGURA 22: Valores de insulina (A) y HOMA (B) en la esteatosis hepática.....	94
FIGURA 23: Estadio de fibrosis según el genotipo de <i>PNPLA3</i> .....	94
FIGURA 24: Curva ROC para la RI según el modelo predictivo.....	99
FIGURA 25: Curva COR para la fibrosis avanzada según el modelo predictivo diseñado.....	104
FIGURA 26: Curva COR comparativa entre el modelo predictivo diseñado y el índice APRI.....	104

## **ÍNDICE DE TABLAS**

### **INTRODUCCIÓN:**

TABLA 1: Factores asociados a la progresión de la fibrosis.....	6
TABLA 2: Estudios de la mutación 148M y la fibrosis en HCC.....	25
TABLA 3: Escala METAVIR.....	34
TABLA 4: Marcadores séricos indirectos de fibrosis hepática.....	36

### **MÉTODOS:**

TABLA 5: Combinaciones fenotípicas de isoformas de la proteína DBP determinadas por la aplicación de software PHASE.....	54
--	----

### **RESULTADOS:**

TABLA 6: Datos epidemiológicos de la infección por VHC de los pacientes estudiados.....	62
TABLA 7: Resultados analíticos basales de la población estudiada.....	63-64
TABLA 8: Características antropométricas de la población estudiada.....	64
TABLA 9: Coeficientes de correlación entre parámetros antropométricos y la edad de la población estudiada.....	65
TABLA 10: Distribución de los genotipos <i>IL28B</i> en la población estudiada.....	65
TABLA 11: Distribución de las isoformas de DBP y de las combinaciones fenotípicas establecidas mediante el programa PHASE.....	66
TABLA 12: Distribución de los genotipos <i>PNPLA3</i> en la población estudiada.....	67
TABLA 13: Coeficientes de correlación entre parámetros bioquímicos seleccionados y parámetros antropométricos.....	68
TABLA 14: Coeficientes de correlación entre parámetros de composición corporal, LBP e IL6.....	69
TABLA 15: Composición corporal en pacientes con y sin RI.....	70
TABLA 16: Coeficientes de correlación entre parámetros de composición corporal y HOMA.....	71
TABLA 17: Coeficientes de correlación entre parámetros bioquímicos nutricionales, IL6 e LBP.....	72
TABLA 18: Parámetros bioquímicos nutricionales en los diferentes estadios evolutivos.....	73
TABLA 19: Parámetros bioquímicos de metabolismo lipídico en los pacientes portadores del alelo T de <i>IL28B</i> .....	73

TABLA 20: Coeficientes de correlación de los oligoelementos con datos bioquímicos....	75
TABLA 21: Coeficientes de correlación entre oligoelementos, IL6 y LBP.....	76
TABLA 22: Oligoelementos en los diferentes estadios evolutivos.....	77
TABLA 23: Oligoelementos en los pacientes portadores del alelo T de <i>IL28B</i> .....	77
TABLA 24: Oligoelementos en los pacientes con y sin RI.....	78
TABLA 25: Coeficientes de correlación de la vitamina A, RBP4 y su cociente con diferentes parámetros bioquímicos.....	79
TABLA 26: Coeficientes de correlación entre vitamina A, RBP4, cociente A/RBP4, IL6 y LBP.....	80
TABLA 27: Vitamina A, RBP4 y cociente A/RBP4 en los pacientes con y sin RI.....	81
TABLA 28: Análisis comparativo de variables continuas por categorías (baja vs. normal) de vitamina A y RBP.....	82
TABLA 29: Coeficientes de correlación de la vitamina D con diferentes parámetros bioquímicos.....	83
TABLA 30: Análisis comparativo de variables continuas por categorías (deficiencia, insuficiencia y normal) de vitamina D.....	84
TABLA 31: Parámetros bioquímicos relacionados significativamente con los fenotipos DBP.....	85
TABLA 32: Parámetros antropométricos relacionados significativamente con los fenotipos DBP.....	86
TABLA 33: HOMA e insulinemia en los diferentes fenotipos DBP, comparación con valores de fenotipo Gc1S/Gc1S.....	87
TABLA 34: Coeficientes de correlación LBP e IL6 con diferentes parámetros bioquímicos.....	89
TABLA 35: LBP e IL6 en los diferentes estadios evolutivos.....	89
TABLA 36: LBP e IL6 en la esteatosis hepática.....	90
TABLA 37: LBP e IL6 en la RI.....	91
TABLA 38: Coeficientes de correlación entre IL6, LBP, HOMA e insulinemia.....	91
TABLA 39: Valores de insulina y HOMA en la esteatosis hepática.....	93
TABLA 40: Parámetros bioquímicos en la RI.....	96
TABLA 41: Variables incluidas en el análisis multivariado de la resistencia a la insulina...	97
TABLA 42: Resultado del análisis multivariado de la resistencia a la insulina.....	98
TABLA 43: Parámetros bioquímicos en la fibrosis hepática.....	101

TABLA 44: Variables incluidas en el análisis multivariado de la fibrosis hepática.....	102
TABLA 45: Resultado del análisis multivariado de la fibrosis.....	103

### APÉNDICE 3

TABLA A1: Relación entre parámetros de composición corporal y estadio de la enfermedad catalogada como fibrosis leve-moderada (F0-F2) y avanzada (F3-F4).....	146
TABLA A2: Datos antropométricos para los diferentes polimorfismos de la <i>IL28B</i> .....	146
TABLA A3: Parámetros de composición corporal en relación con la presencia de esteatosis hepática.....	147
TABLA A4: Datos antropométricos para los diferentes polimorfismos de <i>PNPLA3</i> .....	147
TABLA A5: Datos bioquímicos nutricionales para los diferentes genotipos de la <i>IL28B</i> .....	147
TABLA A6: Datos bioquímicos nutricionales según la presencia de esteatosis.....	148
TABLA A7: Datos bioquímicos para los diferentes genotipos de <i>PNPLA3</i> .....	148
TABLA A8: Datos bioquímicos y la presencia de RI.....	148
TABLA A9: Oligoelementos y presencia de EH.....	148
TABLA A10: Valores de oligoelementos en los diferentes genotipos <i>PNPLA3</i> .....	149
TABLA A11: Relación entre vitamina A, RBP4 y cociente A/RBP4 y el estadio de la enfermedad catalogada como fibrosis leve-moderada (F0-F2) y avanzada (F3-F4).....	149
TABLA A12: Vitamina A, RBP4 y cociente A/RBP4 para los diferentes genotipos de la <i>IL28B</i> .....	149
TABLA A13: Vitamina A, RBP4 y cociente A/RBP4 con y sin EH.....	150
TABLA A14: Vitamina A, RBP4 y cociente A/RBP4 para los diferentes genotipos de <i>PNPLA3</i> .....	150
TABLA A15: Coeficientes de correlación de la vitamina D con IL6 y LBP.....	150
TABLA A16: Relación entre vitamina D y el estadio de la enfermedad catalogada como fibrosis leve-moderada (F0-F2) y avanzada (F3-F4).....	150
TABLA A17: Vitamina D para los diferentes genotipos de la <i>IL28B</i> .....	151
TABLA A18: Valores de vitamina D según la presencia de esteatosis.....	151
TABLA A19: Vitamina D para los diferentes genotipos de la <i>PNPLA3</i> .....	151
TABLA A20: Valores de vitamina D según la presencia de RI.....	151
TABLA A21: Valores de vitamina D para los diferentes fenotipos DBP.....	152

TABLA A22: Valores de LBP e IL6 para los diferentes genotipos de la <i>IL28B</i> .....	152
TABLA A23: LBP e IL6 para los diferentes genotipos de la <i>PNPLA3</i> .....	152
TABLA A24: Valores bioquímicos y la presencia de esteatosis hepática.....	153
TABLA A25: Tabla resumen de variables que presentaron diferencias significativas respecto a la existencia de RI en análisis el univariado.....	154
TABLA A26: Tabla resumen de variables que presentaron diferencias significativas respecto a la existencia de fibrosis leve-moderada frente a fibrosis avanzada-severa en el análisis univariado.....	155

# RESUMEN



## **RESUMEN:**

### **TÍTULO:**

Estado nutricional, metabolismo, inflamación y genética: un enfoque fisiopatológico integrado del progreso lesional en la infección crónica por el virus de la hepatitis C.

### **INTRODUCCIÓN:**

El virus de la hepatitis C (VHC) es una de los principales agentes causales de hepatopatía crónica a nivel mundial. Se estima que ciento setenta millones de personas están infectadas por este virus de forma crónica y aproximadamente cuatro millones adquieren la infección cada año. La historia natural de la infección es variable. Un 80% de los pacientes desarrollan una hepatopatía crónica, de los cuales un 20-30% progresaran a cirrosis y presentarán sus complicaciones, incluyendo la posible aparición de carcinoma hepatocelular.

La infección por el VHC puede influir negativamente en el estado nutricional, tanto en general como en lo relativo a diversos micronutrientes, y además influye de forma directa e indirecta en determinados procesos metabólicos, especialmente en los relacionados con la sensibilidad a la insulina. Estos cambios favorecen el estado proinflamatorio y pueden modificar desfavorablemente la progresión de la enfermedad hepática.

### **OBJETIVO:**

El objetivo principal de este estudio ha sido analizar un conjunto de parámetros fisiológicos susceptibles de ser modificados por la infección crónica por el VHC para identificar a continuación su intervención secuencial en el entramado patogénico que conduce a la progresión de la lesión hepática en la infección por VHC. Como objetivo secundario se estableció la posibilidad de mejora de la capacidad predictiva de fibrosis avanzada ( $F \geq 3$ ) de los tests no invasivos basados en criterios indirectos mediante la inclusión de nuevos parámetros obtenidos en el estudio.



## **PACIENTES:**

Se incluyeron 79 pacientes con hepatopatía crónica por VHC en el período de septiembre de 2013 a mayo de 2014 que recibían seguimiento en nuestro centro. Los criterios de inclusión fueron: 1) pacientes con hepatopatía crónica por VHC con diagnóstico de al menos 6 meses; 2) estadio de fibrosis hepática determinada por histología o por elastografía de transición en los 12 meses previos; 3) consentimiento informado firmado. Se excluyeron aquellos pacientes con: 1) coinfección por el virus de la hepatitis B o por el virus de la inmunodeficiencia humana, 2) consumo crónico de etanol mayor a 40 gramos diarios, 3) que hubieran recibido tratamiento frente al VHC en los 12 meses previos a la inclusión en el estudio o que hubieran recibido suplementos vitamínicos o nutricionales en los 6 meses anteriores, 4) diabetes mellitus, 5) insuficiencia renal, 6) cirrosis hepática descompensada.

## **METODOS:**

Se trata de un estudio observacional y prospectivo. Para cada paciente, en una única visita, se determinó su peso, su talla y su índice de masa corporal. Se realizó un bioimpedancia eléctrica corporal con la que se valoraron los diferentes componentes corporales (grasa, músculo, masa magra, agua corporal total, intracelular y extracelular). Se obtuvo una muestra de sangre venosa en la que se realizaron múltiples análisis bioquímicos (hemograma, coagulación, función hepática, renal, glucosa, HOMA, colesterol y subtipos, oligoelementos y diferentes vitaminas), serológicos en relación con la infección por VHC, inmunológicos (IL6 y LBP) y genéticos (genotipo IL28B, PNPLA3 y Gc). Se sometieron los diferentes resultados a análisis univariados para identificar el parámetro globalmente más significativo. Una segunda fase consistió en considerar dicho parámetro como variable dependiente de un análisis de regresión logística para identificar los factores más directamente relacionados con la misma y proponer un modelo predictivo aplicable en la práctica clínica.

## **RESULTADOS:**

La resistencia a la insulina (RI) es muy frecuente en la hepatopatía crónica por VHC y resultó ser la variable que ocupa un lugar más central en el esquema patogénico de la enfermedad. El análisis de regresión logística identificó como factores relacionados independientemente con la resistencia a la insulina el sexo (OR 10,93; IC 95% 1,42-84,17,  $p=0,01$ ), la edad (OR 1,18; IC 95% 1,04-1,34,  $p=0,001$ ), el agua extracelular (OR 0,83; IC 95% 0,71-0,97,  $p=0,019$ ), la IL6 (OR 2,6; IC 95% 1,37-4,96,  $p<0,001$ ), los triglicéridos (OR 1,02; IC 1-1,048,  $p=0,003$ ), el cociente vitamina A/RBP4 (OR 0,001; IC 95% 0,0001-0,07,  $p=0,001$ ) y la esteatosis hepática (OR 38,49; IC 95% 2,08-710,  $p=0,003$ ). El modelo predictivo basado en estos criterios proporciona un AUROC de 0,94.

Respecto a la fibrosis hepática avanzada, se diseñó un modelo predictivo con un AUROC de 0,91 incluyendo como variables independientes el sexo (OR 11,72; IC 2,38-57,69,  $p=0,001$ ), ser portador del alelo G *PNPLA3* (OR 5,33; IC 95% 1,17-24,13,  $p=0,019$ ), la albúmina (OR 0,029; IC 95% 0,002-0,36,  $p=0,002$ ), HOMA (OR 1,53; IC 95% 1,02-2,28,  $p=0,007$ ), la cistatina C (OR 150,5; IC 95% 0,97-23256,  $p=0,045$ ) y ALT (OR 1,01; IC 95% 1,001-1,02,  $p=0,018$ ).

## **CONCLUSIONES:**

- La resistencia a la insulina está relacionada con múltiples factores nutricionales, metabólicos, inflamatorios y lesionales y ocupa un lugar central en el curso evolutivo de la infección crónica por VHC.
- Se propone un modelo preliminar predictivo de fibrosis avanzada basado en criterios indirectos no invasivos para su desarrollo posterior en series más amplias de pacientes.



## **SUMMARY:**

### **TITLE:**

Nutritional status, metabolism, inflammation and genetics: an integrated physiopathologic approach of the tissue injury progress in the chronic hepatitis C virus infection.

### **BACKGROUND:**

Hepatitis C virus (HCV) is one of the leading causes of chronic liver disease. Estimates indicate that one hundred seventy million people are chronically infected and about three or four million people are newly infected each year. Natural history of HCV infection is variable. About 80% of patients with acute hepatitis C will develop chronic infection, of which about 20-30% will progress to cirrhosis and its consequences, including hepatocellular carcinoma.

The HCV virus infection may adversely affect nutritional status, both in general and in relation to various micronutrients. In addition, it influences directly and indirectly in certain metabolic processes, specially those related to insuline resistance (RI). These changes promove proinflammatory state and may adversely modify the progression of liver disease.

### **AIMS:**

The main aim of this study was to analyze a set of physiological parameters susceptible to modification by chronic HCV infection and then to identify the role of these values in liver injury pathogeny. As secondary aim, the results obtained were used to improve the predictive ability of non invasive methods to define severe fibrosis.

### **PATIENTS:**

This study includes seventy-nine outpatients attending to our Liver Unit between September 2013 and May 2014. Inclusion criteria were: 1) active chronic infection with

HCV for more than 6 months; 2) known METAVIR stage of liver fibrosis disclosed by liver histology or transient elastography within the previous 12 months, and 3) written informed consent. Exclusion criteria were: 1) coinfection with hepatitis B and/or human immunodeficiency viruses; 2) current drinking of > 40 g/day of ethanol; 3) any anti-HCV therapy in the previous 12 months or vitamin and/or mineral supplements in the previous 6 months; 4) diabetes mellitus; 5) creatinine clearance < 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> and, 7) decompensated cirrhosis (ascites was disclosed with ultrasonography).

## **METHODS:**

Prospective observational study in which for each patient all the studies were performed in the same day. Height and body weight were measured to estimate the body mass index (weight in Kg/height in m<sup>2</sup>) and body bioimpedance analysis were performed to estimate various body components (total, intra- and extracellular body water, the proportion of fat and muscle and the lean fat-free mass). A venous blood sample was collected after overnight fast. We obtained multiple biochemical data (complete blood count, coagulation, renal and liver function, cholesterol, glucose, HOMA, oligoelements and vitamin A, E and D), serological data, immunological determinations (interleukine 6 and Lipopolisacarid binding protein) and genetic polymorphisms (IL28B, PNPLA3 and Gc).

Univariate analysis were performed to identify the variable globally more significant. A second phase was to consider this parameter as a dependent variable in a logistic regression analysis to identify factors most directly related to it and propose a predictive model applicable in clinical practice.

## **RESULTS:**

Insuline resistance is common in chronic HCV liver disease and was the main variable related with disease pathogeny. In multivariable analysis sex (OR 10,93; IC 95% 1,42-84,17, p=0,01), age (OR 1,18; IC 95% 1,04-1,34, p=0,001), extracellular (OR 0,83; IC 95% 0,71-0,97, p=0,019), IL6 (OR 2,6; IC 95% 1,37-4,96, p<0,001), triglycerides (OR 1,02; IC 1-1,048, p=0,003), vitamine A/RBP4 ratio (OR 0,001; IC 95% 0,0001-0,07, p=0,001) and

liver steatosis (OR 38,49; IC 95% 2,08-710,  $p=0,003$ ) were associated with IR. The predictive model based on these criteria provides an AUROC of 0,94.

Severe liver fibrosis was associated with sex (OR 11,72; IC 2,38-57,69,  $p=0,001$ ), presence of *PNPLA3* G allele (OR 5,33; IC 95% 1,17-24,13,  $p=0,019$ ), albumin (OR 0,029; IC 95% 0,002-0,36,  $p=0,002$ ), HOMA (OR 1,53; IC 95% 1,02-2,28,  $p=0,007$ ), cystatin C (OR 150,5; IC 95% 0,97-23256,  $p=0,045$ ) and ALT (OR 1,01; IC 95% 1,001-1,02,  $p=0,018$ ). Our predictive model provides an AUROC value of 0,91.

### CONCLUSIONS:

- Insuline resistance is related with multiple nutritional, metabolic, inflammatory and lesional factors and plays a central role in the progression of chronic VHC liver disease.
- We propose a preliminary predictive model for advanced fibrosis based on non invasive values for further development in larger patient series.



# ABREVIATURAS





## **ABREVIATURAS**

**AcVHC:** Anticuerpos contra el virus de la hepatitis C.

**ALT:** Alaninoaminotransferasa.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**AST:** Aspartatoaminotransferasa.

**AUC:** Área bajo la curva.

**BIA:** Impedancia bioeléctrica corporal.

**CD:** Célula dendrítica.

**CEH:** Célula estrellada hepática.

**CHC:** Carcinoma hepatocelular.

**Cu:** Cobre.

**DBP:** Proteína transportadora de vitamina D.

**DE:** Desviación estándar.

**EH:** Esteatosis hepática.

**ET:** Elastografía de transición.

**FA:** Fosfatasa alcalina.

**GGT:** Gamma glutamiltranspeptidasa.

**GLUT4:** Transportador de glucosa tipo 4.

**HCC:** Hepatopatía crónica por virus de la hepatitis C.

**HCSC:** Hospital Clínico San Carlos.

**HOMA:** *Homeostasis model assesment*.

**IFN:** Interferón.

**IL:** Interleucina.

**IL28B:** Interleucina 28B.

**IMC:** Índice de masa corporal.

**INR:** *International normalized ratio*.

**kPA:** Kilopascales.

**LBP:** *Liposaccharyde-binding protein*

**LPS:** Lipopolisacárido intestinal.

**MHC:** Complejo mayor de histocompatibilidad.

**NF- $\kappa$ B:** Factor nuclear  $\kappa$ B.

**NK:** Célula *natural killer*.

**PAMPs:** Estructuras moleculares asociadas a patógenos.

**PNPLA3:** Gen *patatin like phospholipasa 3*.

**PPAR $\alpha$ :** Receptor peroxisomal tipo  $\alpha$ .

**RBP4:** Proteína transportadora de retinol.

**RI:** Resistencia a la insulina.

**RIQ:** Rango intercuartílico.

**Se:** Selenio.

**SNP:** *Single nucleotide polymorphism*.

**SOCS3:** Supresor de señalización de citocinas 3

**SREBPs:** Proteínas de unión al elemento de respuesta a esteroides.

**TGF $\beta$ :** Factor de crecimiento tisular  $\beta$ .

**Th:** Respuesta *T helper*.

**TLR:** Receptor *toll-like*.

**VDR:** Receptor de la vitamina D.

**VHC:** Virus de la hepatitis C.

**Zn:** Zinc.

# **I.- INTRODUCCIÓN**



## I.- INTRODUCCIÓN

### 1.- VIRUS DE LA HEPATITIS C:

El virus de la hepatitis C (VHC) fue descrito molecularmente a final de la década de los 80 por Michael Houghton y sus colaboradores. Se realizó una clonación de su material genómico y se desarrolló un test que permitiera su diagnóstico (1). Hasta ese momento se habían descrito numerosos casos de hepatitis aguda y crónica, especialmente en pacientes con antecedentes transfusionales, que habían sido bautizados con el nombre de Hepatitis no A no B, ya que no presentaban los perfiles serológicos característicos para los cuadros producidos por esos virus.

#### 1.1.- **Virología:**

##### 1.1.1.- Estructura genómica:

El VHC se encuentra dentro de la familia *Flaviviridae*. En ella existen tres géneros: *Pestivirus*, *Flavivirus* y *Hepacivirus*. El VHC es el único componente del último de ellos (2).

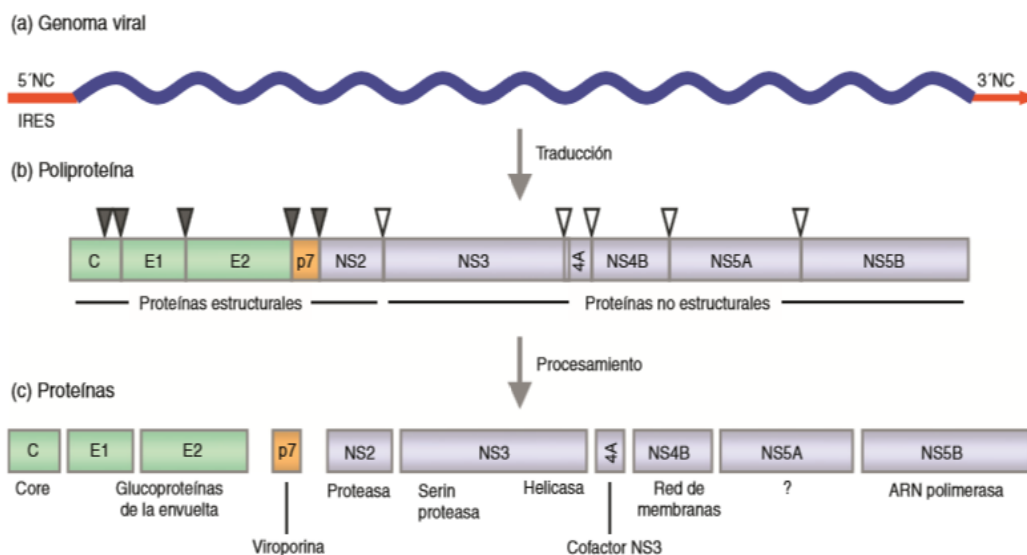
Se considera que la estructura tridimensional del VHC, por analogía con otros virus, tiene una envoltura lipoproteica de forma icosaédrica, con sus proteínas estructurales, que recubre una nucleocápside formada por la proteína del core y el genoma vírico(3).

El VHC es un virus cuyo material genético es una cadena de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad positiva de una longitud aproximada de 9600 nucleótidos. Su región codificante da lugar a una poliproteína que, por la acción de proteasas víricas y de la célula huésped, se divide en 10 proteínas individuales. Éstas se catalogan en estructurales y no estructurales (4)(Figura 1).

Dentro de las **proteínas estructurales** se encuentra la proteína del core que forma parte de la nucleocápside y que podría intervenir en diferentes vías de señalización celular que cumplen un papel fundamental en el ciclo vital del VHC (5).

Las **proteínas no estructurales** cumplen funciones enzimáticas fundamentales para la replicación y el procesamiento del VHC. Entre ellas, encontramos NS5B que es la polimerasa viral dependiente de ARN (6).

**Figura 1: Estructura genómica del VHC.** De Koutsoudakis y Col. *Biología molecular aplicada del virus de la hepatitis C*. GastroenterolHepatol. 2013;36(4):280–93.(7)



### 1.1.2.-Variabilidad genética:

El genoma del VHC presenta una gran heterogeneidad. Esto es debido en parte a que la ARN polimerasa viral carece de capacidad de corrección de los nucleótidos inadecuados, por lo que se calcula que de cada  $10^4$  a  $10^5$  nucleótidos copiados se produce un error. Además, debemos tener en cuenta que la alta tasa de replicación viral, con una producción diaria de  $10^{10}$  a  $10^{12}$  viriones, también favorece esta característica.

Las manifestaciones de esta heterogeneidad reciben diferentes nombres. En primer lugar, encontramos los **genotipos virales**. Se han descrito 7 genotipos diferentes del VHC que difieren entre ellos hasta en un 34% de sus nucleótidos(8). Dentro de cada genotipo existen hasta 50 **subtipos** con una similitud de secuencia de hasta el 80%. Por último, dentro de cada sujeto infectado por el VHC, podemos descubrir diferentes **cuasiespecies**. Son secuencias heterogéneas del virus que se deben a mutaciones producidas en la replicación(9).

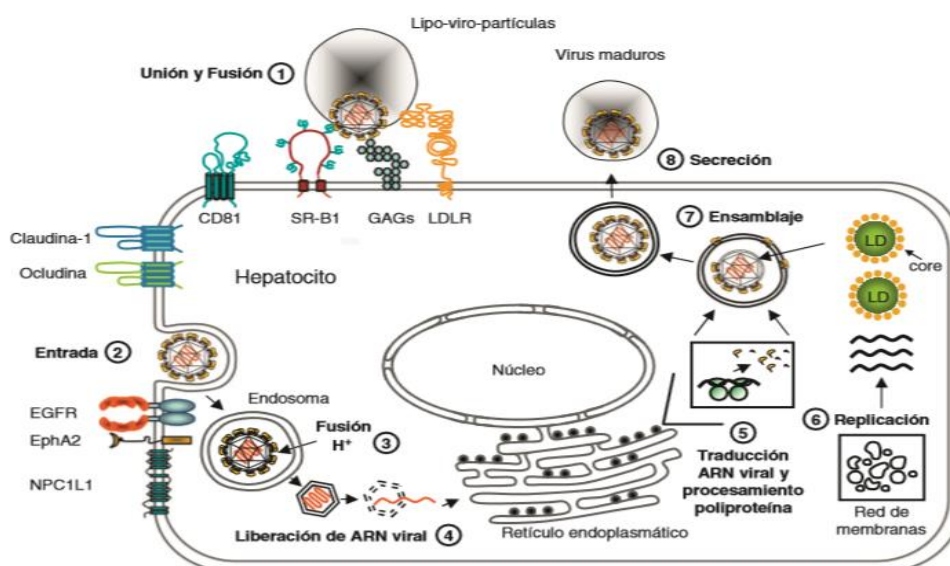
Esta variabilidad genética es uno de los mecanismos implicados en el escape de la respuesta inmunológica, en la respuesta al tratamiento y en la producción de una infección persistente (10).

### 1.1.3.- Ciclo vital (Figura 2)

Las partículas virales circulan de manera libre o unida a lipoproteínas (11). A través de las fenestraciones de las células endoteliales que recubren los sinusoides llegan a los hepatocitos. La fusión del virus con la célula hepática viene dada por la interacción de diferentes proteínas de la membrana viral con cofactores y receptores celulares (12,13).

El virus es introducido en el hepatocito por un proceso de endocitosis. La envuelta viral es destruida por el pH ácido de los endosomas y en el citoplasma celular queda la cadena de ARN libre (14). Ésta es traducida y replicada dentro de la célula hepática. Se originan nuevas partículas de VHC que se liberan a través de las vías de secreción celular (15).

Figura 2: Ciclo de vida del VHC. De Koutsoudakis y Col. Biología molecular aplicada del virus de la hepatitis C. Gastroenterol Hepatol. 2013 Apr;36(4):280–93.(7)



El papel del metabolismo lipídico en los procesos de ensamblaje y liberación del virus está cada vez más claro. Estudios recientes han demostrado que el core viral se localiza principalmente en la membrana que rodea las gotas lipídicas intracelulares y es



justo en esa localización donde se produce el reclutamiento del resto de proteínas y el ensamblaje viral (11,16).

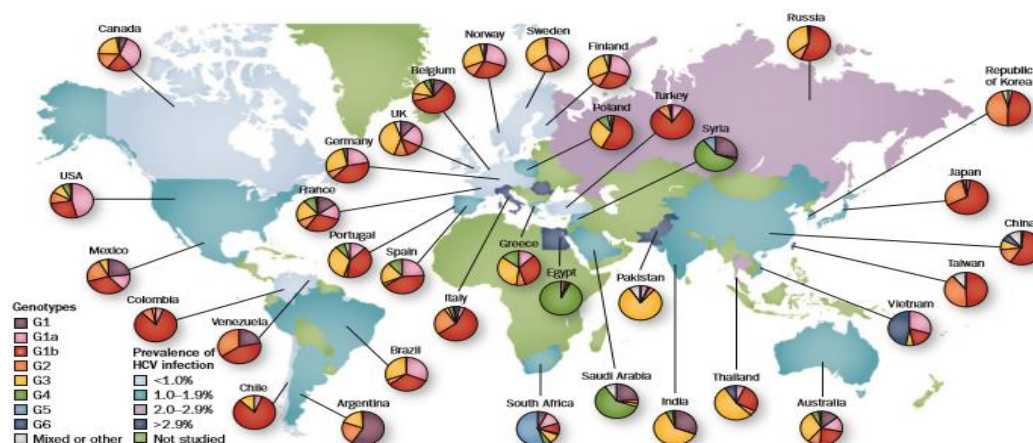
### 1.2.- Epidemiología:

La prevalencia global estimada de la infección por VHC es del 2-3% de la población mundial. Esto equivale a que entre 130 y 170 millones de personas están infectadas. La distribución de la infección por VHC es muy variable, así como la distribución geográfica de los genotipos virales (Figura 3). Los países en vías de desarrollo de África y de Oriente Próximo poseen las mayores tasas de prevalencia, con hasta un 15% en Egipto. Sin embargo, en zonas europeas o de América del Norte estas cifras son normalmente menores al 2% (17,18).

Respecto a los datos de incidencia, son aún más variables y se considera que podrían estar infraestimados debido a que normalmente la infección aguda por VHC cursa de forma asintomática. Aproximadamente 8,5 de cada 100.000 europeos son infectados al año (19).

En España, aunque los datos son de la década pasada, existe una de las mayores tasas de prevalencia de Europa, con un 2,64% (20). Las cifras de incidencia han disminuido de 2,8/100.000 habitantes en 1997 a 0,6/ 100.000 habitantes en 2005 (21). Esto se explica por los cambios en los mecanismos de transmisión que han acontecido en los últimos tiempos, con una caída importante en los casos infectados de forma iatrogénica. Actualmente, el mayor factor de riesgo para infectarse por el VHC de la población española es el uso de drogas por vía parenteral (22).

**Figura 3:** Distribución geográfica de la infección por VHC. De Hajarizadeh B. Epidemiology and natural history of HCV infection. Gastroenterol Hepatol. 2013. (17).



### 1.3.- Historia natural de la infección:

La mayoría de las **hepatitis aguda por VHC** suele tener un curso asintomático. Entre las semanas 2 y 12 desde la infección, de un 10 a un 20 % de los pacientes presentan ictericia, con valores de bilirrubina total habitualmente inferiores a 12 mg/dl, y hasta un 30% de los enfermos refieren síntomas inespecíficos como astenia, náuseas y vómitos. La elevación de aminotransferasas (ALT y AST) suele darse alrededor del mes de la infección y habitualmente el valor pico está entre las 400 y las 1000 UI/l (23).

La detección de ARN viral en sangre es posible a partir de la segunda semana desde el inóculo. La aparición de anticuerpos anti-VHC (AcVHC) se produce entre los 15 días y los 3 meses desde la infección. Este es el llamado periodo ventana (24). El aclaramiento viral, definido como un ARN de VHC indetectable en sangre, se da en un 25% de los pacientes y conlleva a la curación de la infección (25).

El 75% de los pacientes infectados por VHC evolucionan hacia una hepatopatía crónica (HCC). El mayor riesgo al que están expuestos es a la **progresión de la fibrosis**. Se estima que aproximadamente un 20% de los pacientes evolucionan a padecer cirrosis hepática a los 20 años de la infección (26). Sin embargo, la infección no produce siempre una enfermedad progresiva. En un estudio prospectivo en pacientes con infección crónica por VHC, se definieron tres posibles patrones evolutivos: fibrosantes lentos, rápidos e intermedios (27). En este punto, también se ha demostrado la influencia de determinados factores virales y del huésped (Tabla 1). Por lo general los pacientes con HCC están asintomáticos o tienen síntomas leves poco específicos hasta fases avanzadas de la fibrosis.

La tasa de aparición de carcinoma hepatocelular (CHC) se ha estimado en un 1-3% de los pacientes a los 30 años de infección (28). Tanto ésta como la mayoría de las restantes complicaciones de la HCC están limitadas en su mayor parte a pacientes que han desarrollado cirrosis. Las complicaciones se presentan en un 3,9% por año. La tasa de supervivencia en pacientes con cirrosis compensada a los 5 años se sitúa en un 79%. Tras la aparición de descompensación, desciende al 50% (29).

**Tabla 1:** Factores asociados a la progresión de la fibrosis.

FACTORES VIRALES	FACTORES HUÉSPED	FACTORES EXTERNOS
Genotipo 3 (30)	Edad (>40 años)(31)	Alcohol (27)
Tiempo de infección (32)	Sexo (Varón) (33)	Tabaco (34)
	Raza (Afroamericana)(32)	Cannabis (34)
	Fibrosis inicial(29)	Fármacos
	Coinfección VIH/VHB (35,36)	Dieta
	Esteatosis (37)	
	Síndrome metabólico (38)	
	Niveles altos de ALT (39)	
	Sobrecarga férrica (40)	

Durante la evolución de la HCC, hasta un 40% de los pacientes presentan manifestaciones extrahepáticas. Las más frecuentes son las reumatológicas y las cutáneas y se considera que son debidas a la conjunción de procesos autoinmunes, formación de inmunocomplejos y linfotropismo viral (41).

#### **1.4.- Diagnóstico virológico:**

La búsqueda de infección crónica por el VHC forma parte del estudio de un paciente con elevación persistente de transaminasas. La clonación y secuenciación del genoma en el año 1989 permitió el desarrollo de métodos diagnósticos directos e indirectos.

Las **técnicas indirectas** se basan en pruebas serológicas que determinan la presencia de AcVHC. Hasta el momento, se han desarrollado dos tipos de técnicas para la detección de estos AcVHC, la inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbant Assay*) y la inmunotransferencia con antígenos recombinantes (RIBA). Estos métodos son los utilizados como primer cribado de la infección por VHC, con una sensibilidad y especificidad diagnósticas del 98 y 99% respectivamente (42).

Los **métodos virológicos o directos** determinan y cuantifican el ARN viral mediante la detección de fragmentos del genoma viral. Son útiles en el diagnóstico de hepatitis agudas o crónicas seronegativas y fundamentales en el seguimiento de la

respuesta a los tratamientos actuales. Dado que el material genético del virus circulante es limitado, será necesario amplificarlo. Las técnicas utilizadas son la transcripción inversa con reacción en cadena de la polimerasa, la transcripción mediada por amplificación y el sistema “Branched”; entre ellas existen diferencias en los umbrales de detección. Actualmente, la detección de la carga viral del VHC se realiza mediante PCR a tiempo real que en el mismo momento permite detectar y amplificar el material genético viral con un límite inferior de detección de 15 UI/ml (43).

La **determinación del genotipo** se realiza mediante técnicas moleculares basadas en la amplificación de regiones específicas del genoma viral. La región más empleada es la 5'UTR, donde se localizan de forma más exacta las diferencias que caracterizan a los distintos genotipos y subtipos (44). El genotipo viral es un dato relevante en la infección por VHC, ya que determina la duración y el tipo de tratamiento a emplear y la posibilidad de respuesta al mismo.

### **1.5.- Papel de la interleucina 28B en la HCC:**

En los últimos años se han desarrollado diferentes estudios genómicos (GWAS) para investigar la asociación de determinados polimorfismos genéticos y su influencia en la HCC. En 2009, se identificó en el cromosoma 9 un polimorfismo en la vecindad del gen *IL28B* denominado rs12979860, que codifica la síntesis de un tipo de interferón (IFN), el interferón  $\lambda$  3 (45).

Se han descrito tres genotipos *IL28B* diferentes: CC, CT y TT. El presentar un genotipo favorable (CC) significa, principalmente, tener unas altas tasas de respuesta a los tratamientos basados en IFN(46); pero también se han observado tasas mayores de aclaramiento viral espontáneo en la hepatitis aguda por VHC (45).

Respecto a la lesión tisular, se han realizado diferentes estudios con resultados dispares. En pacientes con genotipo CC se han observado tasas menores de fibrosis y de esteatosis hepática (EH), si bien, mayores rasgos de actividad necroinflamatoria(47). A su vez, se han descrito más casos de resistencia a la insulina (RI) y de hipertrigliceridemia en pacientes con genotipo desfavorable que en pacientes CC (48,49).

El mecanismo de estas relaciones no está bien establecido. Se considera posible que el genotipo *IL28B* module la expresión de genes activados por IFN, que genera un

estado preinmunológico favorable para la respuesta antiviral aún más potenciada por el tratamiento, pero que también podría colaborar en una mayor actividad inflamatoria tisular(47).

## **2.- ASPECTOS NUTRICIONALES DE LA HCC:**

El hígado es un órgano con múltiples funciones sintéticas, reguladoras y detoxificantes, por lo que una disfunción hepatocelular importante se acompaña de la presencia de malnutrición.

La prevalencia de malnutrición en pacientes hepatópatas varía ampliamente debido a la heterogeneidad de los enfermos, de la etiología y de la gravedad de la enfermedad. Así, dependiendo de los estudios, del tipo de enfermo incluido y de los métodos de valoración del estado nutricional empleados, encontramos resultados muy dispares que sitúan la prevalencia de malnutrición entre un 10 o un 100% de los enfermos (50). Cabe destacar que la malnutrición aumenta con la severidad de la enfermedad hepática, pero que se inicia en fases relativamente tempranas, en pacientes compensados y con buena reserva hepática. Se considera que una cuarta parte de los enfermos en estadio A de la clasificación de Child-Pugh están malnutridos (51). Existen escasos estudios que describan el estado nutricional global de pacientes con HCC. En 2012, Ismail *et al.* describieron una tasa de malnutrición moderada del 14% en pacientes con HCC sin datos de disfunción hepática, mientras que ésta se elevaba al 36% y al 64% en pacientes con cirrosis compensada y descompensada respectivamente (52).

El estado de hipercatabolismo, la malabsorción y la ingesta disminuida se encuentran entre las causas que conducen al desarrollo de la insuficiencia nutricional (53). La presencia de ésta es un importante factor de mal pronóstico (54), por lo que su correcta valoración es de vital importancia.

No existe un consenso para el diagnóstico y la clasificación de la malnutrición en pacientes con hepatopatía. La valoración nutricional de estos pacientes presenta especial dificultad debido a que los parámetros más comúnmente utilizados, se ven afectados por la propia enfermedad (55). De esta forma, es fácil encontrar datos bioquímicos alterados aún en situaciones de buen estado nutricional debido al déficit

de síntesis proteica que produce la disfunción hepática. A su vez, los parámetros inmunológicos no son herramientas fiables ya que la propia patología puede producir linfopenia, anomalías en las pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada y disminución de los valores del complemento(56).

A continuación, se detallan la utilidad de los parámetros nutricionales utilizados en este proyecto, así como los resultados de estudios realizados previamente.

### **2.1.- Valoración nutricional mediante parámetros antropométricos:**

Los pacientes con HCC presentan parámetros antropométricos alterados, especialmente en estadios avanzados, por la presencia de edemas o ascitis. De esta manera, las medidas antropométricas por excelencia que son el peso y el cálculo del índice de masa corporal (IMC) presentan una baja sensibilidad en estos sujetos. Su mantenimiento dentro del intervalo normal puede acompañarse de una pérdida de masa muscular y tejido adiposo a expensas de una mayor retención de agua (57).

La medición de los pliegues cutáneos, tricipital y subescapular, se considera un buen método indirecto de estimar la masa grasa corporal. La circunferencia muscular del brazo es un buen predictor de la masa magra total. Ambas medidas se ven rara vez alteradas por la presencia de descompensación edemoascítica, por lo que se trata de herramientas útiles en la valoración nutricional del paciente con HCC (58). Sin embargo, no aportan información completa sobre todos los parámetros de la composición corporal.

La impedancia bioeléctrica corporal (BIA) es una técnica sencilla de aplicar, segura y barata. Se basa en la aplicación de una corriente eléctrica alterna de una intensidad muy pequeña en el cuerpo humano. La impedancia corporal representa la oposición que muestran los materiales biológicos al paso de la corriente aplicada. Se aplica el principio de que los tejidos corporales se comportan como conductores en mayor o menor medida de la corriente eléctrica, por lo que las soluciones electrolíticas intra o extracelulares son óptimos conductores mientras que el hueso o el tejido adiposo no conducen corriente (59). La BIA asume que el cuerpo humano está constituido por dos compartimentos principales, la masa grasa y la masa libre de grasa o masa muscular,

que expresa en forma de porcentajes. Dentro del componente de la masa muscular se encuentra el agua corporal total que está formada por un componente intracelular y otro extracelular, que la BIA expresa en litros. La aplicación de corrientes eléctricas con diferentes frecuencias permite la valoración de estos componentes corporales. Posteriormente, con la aplicación de diferentes fórmulas matemáticas basadas en modelos de regresión, se obtiene también la caracterización de otros compartimentos como es la masa celular corporal o la masa magra seca (60,61).

Aunque esta técnica no está exenta de limitaciones, especialmente en los casos de hidratación variable o presencia de ascitis, la Sociedad Europea de Nutrición Enteral y Parenteral recomienda la utilización de BIA en pacientes con hepatopatía crónica con un nivel de evidencia B (62).

Más allá de su utilidad en la valoración nutricional, existen diferentes estudios sobre la utilidad de la BIA en pacientes con hepatopatía crónica en otros aspectos. Los valores obtenidos de agua corporal total están relacionados con el estadio de progresión de la enfermedad (63,64) y otros valores como el ángulo de fase o la masa magra corporal, también marcan un factor pronóstico de la HCC (65). Además, se ha postulado la aplicabilidad de BIA para la valoración de la presencia de EH, con resultados prometedores. En un estudio con BIA abdominal, valores elevados de MG abdominal se relacionan con la presencia de EH con un área bajo la curva (AUC) de 0,82 (66).

No existen muchos estudios publicados sobre el uso de la BIA en pacientes únicamente con HCC. Antakiet *al.* valoraron la utilidad de la BIA para la estimación del grado de fibrosis hepática en pacientes con HCC, sin que ésta ofreciera resultados prometedores a la hora de distinguir fibrosis leve de avanzada (67). Por otro lado, también existe un estudio que señala los cambios en la composición corporal en pacientes con HCC tratados con biterapia, demostrando una reducción significativa de la masa grasa, agua corporal total y masa magra después del tratamiento (68).

## **2.2.- Valoración nutricional mediante parámetros bioquímicos:**

### **2.2.1.- Componentes plasmáticos: albúmina, pre-albúmina, colesterol.**

La mayoría de las sustancias plasmáticas más relacionadas con el estado nutricional de un sujeto sano son sintetizadas por el hígado. Estos marcadores, en

situación de disfunción hepática, se encuentran lógicamente disminuidos. De una cohorte de pacientes cirróticos con diferentes grados de insuficiencia hepática, se describió que únicamente el 18% tenía unos niveles normales de albúmina (69). Es por esto que estas proteínas poseen una baja especificidad para el diagnóstico de malnutrición en pacientes hepatópatas y son únicamente útiles en los estadios más precoces de la enfermedad.

### 2.2.2.- Oligoelementos

El **selenio (Se)** es un micronutriente esencial que se organifica a través de su unión con el aminoácido cisteína, originando L-seleniocisteína que se integra en la estructura de al menos 25 proteínas, denominadas selenioproteínas, las más importantes de las cuales constituyen la familia de las glutathionperoxidasas, que juegan un papel protagonista en los mecanismos antioxidantes dentro y fuera de la célula. Otras selenioproteínas son la tioredoxin-reductasa, la yodotironindeiodinasa y la selenioproteína P (70–72). La deficiencia grave de Se produce una miocardiopatía gravemente progresiva denominada enfermedad de Keshan(70).

Dado que el Se está relacionado con la defensa antioxidante y que el daño oxidativo participa en la progresión de la hepatopatía crónica por VHC es adecuado analizar si existe deficiencia de este micronutriente en esta enfermedad y en qué modo está relacionada con su gravedad. La deficiencia de Se es frecuente en la hepatopatía alcohólica avanzada (73) pero los datos en la infección crónica por VHC son escasos, contradictorios y obtenidos de estudios de escasa calidad metodológica (74–76) por lo que hemos considerado pertinente incluir la determinación de Se en suero en el protocolo de este estudio nutricional en la infección crónica por VHC y su posible relación con factores metabólicos y rasgos evolutivos de la enfermedad.

El **cobre (Cu)** es un oligoelemento esencial para la activación de múltiples enzimas oxidasas así como el factor nuclear  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) (77,78). El exceso de Cu sérico se ha relacionado con estados de disfunción inmunológica, con un aumento de respuestas inflamatorias y de reacciones de estrés oxidativo (79). Aunque no todos los resultados son homogéneos, en la HCC se han objetivado valores elevados de Cu respecto a



controles sanos (79–81). Estos niveles se encuentran relacionados con los niveles de fosfatasa alcalina (FA), de  $\gamma$ glutamilttransferasa (GGT) y con la carga viral de VHC (75).

El **zinc (Zn)** es otro nutriente que juega un papel fundamental en la activación de hasta 300 enzimas relacionadas con el metabolismo proteico, la respuesta inmunológica y otras funciones fisiológicas como la reproducción sexual o la función neurosensorial (82). Se ha descrito una mayor prevalencia de deficiencia de Zn en pacientes con hepatopatía crónica de diferentes etiologías, relacionada con el estadio de fibrosis de la enfermedad y la aparición de complicaciones como la encefalopatía hepática (83–85). En la HCC, por la capacidad del Zn de inhibir la activación de NF- $\kappa$ B, se ha postulado su utilidad como suplemento en la terapia antiviral, con resultados llamativos en la normalización de transaminasas durante el tratamiento con biterapia con IFN pegilado y ribavirina (86). Cabe destacar también que se ha descrito una relación entre los niveles de Zn y la presencia de alteraciones en el metabolismo hidrocarbonado en la HCC (87).

### 2.2.3.- Vitamina A y RBP4

La vitamina A (*all-trans*-retinol) es un retinoide natural (88). Procede de la alimentación, bien en forma de retinoides preformados o de carotinoides, que son precursores que se transforman en el organismo en retinoides (89). El principal órgano de almacenamiento de la vitamina A – en forma de retinil-ésteres - en el organismo es el hígado, especialmente en los hepatocitos (10-20 % del total) y sobre todo las células estrelladas (80-90 % restante), que almacenan gran cantidad de retinil-ésteres en sus gotas lipídicas, el más abundante de los cuales es el retinil palmitato (90). La vitamina A propiamente dicha se libera de forma constante de los retinil-esteres por hidrólisis (91) y pasa a la sangre unida a la proteína transportadora de retinol (RBP: *retinol-binding protein*). Otro tejido que almacena vitamina A aunque en cantidad sensiblemente menor es el tejido adiposo (92). El retinol liberado de los depósitos es transportado a todas las células donde ejerce sus funciones.

La función clásica de la vitamina A es participar en la formación del pigmento visual retiniano, mejorando la visión nocturna. Este efecto lo ejerce tras su transformación en 11-*cis*-retinal. El resto de las funciones fisiológicas de la vitamina A exigen su transformación en ácidos *all-trans*-retinoico y 9-*cis*-retinoico, que son los

responsables finales de la mayoría de los demás efectos fisiológicos. La vitamina A regula la proliferación y diferenciación celular y modula la respuesta inmune mediante su interacción con centenares de genes (93). Una de las cualidades fisiológicas inherentes a la vitamina A es su capacidad de neutralizar radicales libres (94).

El 95 % de la vitamina A en plasma se halla unida a la proteína transportadora de retinol (RBP). Esta proteína es el producto de un gen denominado *RBP4* tras su identificación en el Proyecto Genoma Humano. La proteína resultante se denomina indistintamente RBP o RBP4 y es la única proteína con capacidad de transporte de vitamina A en la sangre. Conviene no olvidar esta doble designación para evitar confusión. El complejo retinol-RBP4 circula en sangre unido a otra proteína, la transtiretina o prealbúmina, que le da estabilidad e impide la pérdida de la RBP4 por la orina (90). A su vez, la vitamina A es transportada en pequeñas cantidades por otros vectores no proteicos, especialmente quilomicrones y como  $\beta$ -glucurónidos de retinol hidrosolubles (95).

Por lo tanto, la concentración plasmática de vitamina A en condiciones normales depende casi en exclusiva de la concentración de RBP4. Por eso muchos autores sugieren que el mejor modo de establecer si hay o no deficiencia de esta vitamina es mediante el cociente Vitamina A/RBP4 en suero. Otros, sin embargo, siguen recomendando la determinación de retinol en el suero. Probablemente ambos métodos son válidos, pero hay que tener en cuenta que la RBP4 puede estar disminuida como consecuencia de un proceso inflamatorio que infrarregula su producción y es muy sensible a procesos que inducen malnutrición, y que el organismo trata de mantener niveles circulantes normales de vitamina A aunque los depósitos estén disminuidos y solo cuando están casi exhaustos hay un descenso de la concentración sérica de retinol (96).

La deficiencia de vitamina A es relativamente frecuente en la hepatopatía crónica por VHC, aunque no abundan los datos publicados al respecto (74,94,97). En la HCC, como en otras muchas hepatopatías inflamatorias, se produce un incremento del daño oxidativo por liberación de radicales libres en el curso del proceso inflamatorio, y una activación de las células estrelladas que se transforman en miofibroblastos y pierden sus gotas lipídicas y su contenido en vitamina A. De este modo puede ocurrir que el daño

oxidativo se incrementa al tiempo que se reduce la disponibilidad de vitamina A como antioxidante (98).

Recientemente se han obtenido datos que indican que la RBP4 no se limita únicamente a transportar vitamina A, sino que tiene otras funciones independientes y que su sobreexpresión incrementa el riesgo de desarrollar RI(99), diabetes de tipo 2 y obesidad (100–103) aunque otros grupos no confirman esta posibilidad (104,105). La RI es frecuente en la HCC (106). Esto justifica, a nuestro juicio, que se analicen simultáneamente los niveles de vitamina A y de RBP4 para comprobar posibles diferencias en su relación con los parámetros bioquímicos y genéticos implicados en la RI. Hasta donde hemos podido averiguar, no hay estudios que hayan realizado ambas determinaciones en pacientes con infección crónica por VHC.

#### 2.2.4.- Vitamina D y su proteína transportadora. Gen Gc.

El calcitriol [1,25 (OH)<sub>2</sub> Vitamina D], la forma activa de la vitamina D, es el resultado de dos hidroxilaciones sucesivas de la vitamina D que se producen en el hígado (25-hidroxilación) y en el riñón (1-hidroxilación)(107,108). El calcitriol forma parte del sistema hormonal que mantiene la homeostasis del calcio y el fósforo. Además, la vitamina D posee efectos inmunomoduladores puesto que reduce la concentración de citocinas proinflamatorias y promueve la respuesta inmune innata (109–111). Se ha comprobado además que se produce síntesis de calcitriol en muchos tejidos, lo que permite que exista actividad local de la vitamina que se produce donde y cuando se necesite actuando como un factor autocrino-paracrino(107). (Figura 4)

En la HCC, la deficiencia de vitamina D es frecuente (112–114). En un trabajo anterior de nuestro grupo (115) hemos demostrado que el 77 % de los enfermos con infección crónica por VHC que no reciben suplementos de vitamina D tienen concentraciones subóptimas (20-30 µg/ml) o claramente deficientes (< 20 µg/ml) de 25-OH colecalciferol en plasma. Aunque no es la forma activa de la vitamina D, el 25- OH colecalciferol es el precursor predominante en la sangre y el que se determina habitualmente para establecer la disponibilidad de vitamina D (116).

Sus niveles se relacionan de forma inversa con los estadios de fibrosis (117,118) y también con la aparición de manifestaciones extrahepáticas (119). Las causas de esta

alteración no están bien establecidas, si bien se considera que en una disfunción hepática la producción de 25-hidroxivitamina D puede estar disminuida, así como la síntesis de su proteína transportadora. Además, en hepatopatías avanzadas existe una absorción reducida de las vitaminas liposolubles, incluyendo los precursores de la vitamina D (120,121).

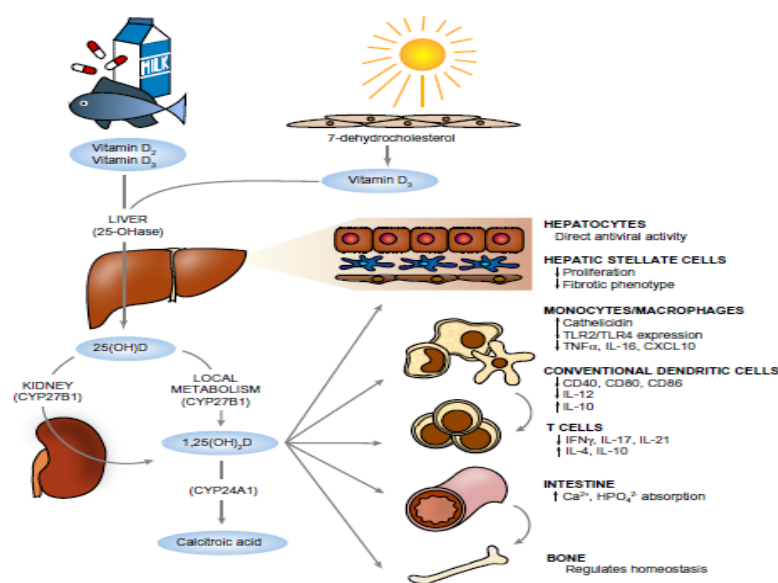
Por su efecto inmunomodulador y antiinflamatorio, se ha considerado que la vitamina D puede tener un efecto protector en la HCC así como contribuir de forma positiva a los resultados de su tratamiento (Figura 4). Los niveles de vitamina D se han relacionado con la obtención de respuesta viral rápida y su déficit con fracasos terapéuticos, sin resultados definitivos (114,122–124). Existen estudios prospectivos que investigan el efecto de su adición a los regímenes de interferón pegilado y ribavirina. Sus métodos y resultados no son homogéneos pero indican que la administración de suplementos de vitamina D durante el tratamiento mejora las tasas de respuesta viral sostenida en pacientes infectados por VHC genotipos 1, 2 y 3 (125–127) sin que esto parezca aplicable al genotipo 4 (128). No existen datos en la actualidad sobre estas estrategias en esquemas terapéuticos que incluyen los antivirales directos.

La síntesis, el transporte y la acción fisiológica de la vitamina D dependen de la actuación secuencial de una serie de enzimas. El 25 (OH) colecalciferol generado en el hígado por acción de la 25-OH hidroxilasa es vehiculado en la sangre por la proteína transportadora de vitamina D (DBP: *Vitamin D binding protein*) hasta acceder al riñón donde CYP27B1 es la isoforma del citocromo P450 responsable de la segunda hidroxilación (1-OH). La vitamina D interacciona con su receptor celular específico (VDR: *Vitamin D receptor*) para ejercer sus funciones fisiológicas (129).

Los genes que codifican la síntesis de DBP, CYP27B1 y VDR son asiento de polimorfismos genéticos que modifican su actividad y por tanto influyen sobre la función de sus productos finales. En un estudio previo de nuestro grupo (130) al que remitimos para mayor información hemos analizado los polimorfismos de los genes *CYP27B1* y *VDR* en enfermos con infección crónica por VHC sin que hayamos detectado relación con el estadio evolutivo de la enfermedad, aunque determinados polimorfismos de un solo nucleótido (SNP: *single nucleotide polymorphism*) de *VDR* guardan relación con la probabilidad de respuesta al tratamiento antiviral con IFN pegilado y Ribavirina.

La **proteína transportadora de vitamina D** o Gc-globulina es una glicoproteína multifuncional de 51-58 kDa sintetizada de forma casi exclusiva por los hepatocitos y segregada a la circulación como un péptido de 458 aminoácidos y tres dominios estructurales (131–133). Posee dos regiones de ligamiento bien definidas, una entre los aminoácidos 35 y 49 destinada a unirse con la vitamina D y ácidos grasos y otra entre los aminoácidos 350 y 403 que se liga a la actina. Se han identificado puntos de unión en la membrana celular para los dominios N-terminal y C-terminal que parecen necesarios para que la DBP pueda ejercer sus funciones celulares (134).

**Figura 4: Metabolismo y funciones de la vitamina D.** De Rahman AH y Col. Vitamin D for your patients with chronic hepatitis C? J Hepatol. 2013 Jan;58(1):184–9. (135)



La principal función de la DBP es el transporte de la vitamina D y sus metabolitos en el plasma ya que transporta del 85 al 90% de la 25-OH vitamina D (136). Esta unión es firme y por lo tanto esta fracción de la vitamina D circulante no está disponible para su liberación inmediata, sino que está en equilibrio con la fracción lábilmemente unida a la albúmina (9 % del total) y la que circula en forma libre (1 % del total). Los métodos habituales de laboratorio miden la cantidad total de 25-OH vitamina D en el plasma, pero no la fracción funcionalmente disponible.

El **gen Gc** (*group-specific component*) o **DBP** (NCBI GENE ID2638) está ubicado en 4q12-1q13 y tiene 13 exones. Es un miembro de una familia de genes que incluye los de albúmina, alfa fetoproteína y  $\alpha$ -albúmina/afemina dispuestos en tándem (137). Es un gen altamente polimórfico aunque las dos variantes más estudiadas son dos SNP

situados en el exón 11 y que determinan un cambio de aminoácido. Son los denominados rs7041 y rs4588. El primero genera un cambio de guanina por timidina (GAT/GAG) en el codón 416 (rs7041GT) que se traduce en un cambio de aminoácido Glu→Asp y el segundo de citosina por adenina (ACG-AAG) en el codón 420 (rs4588CA) que induce un cambio de aminoácido Thr→Lys (138).

Estos SNPs dan lugar a distintas isoformas de la DBP con diferentes afinidades por la vitamina D, lo que explica que haya grandes diferencias interindividuales en la concentración de 25-OH vitamina D en el suero sin que por ello exista deficiencia funcional de dicha vitamina. Hasta el momento las isoformas descritas reciben las siguientes nomenclaturas:

- Haplotipo rs7041T/rs4588C: isoforma Gc1F.
- Haplotipo rs7041G/rs4588C: isoforma Gc1S
- Haplotipo rs7041T/rs4588A: isoforma Gc2

Las otras posibles combinaciones alélicas no aparecen descritas en la literatura (139) aunque tampoco haya evidencia absoluta de que no puedan existir debido a desequilibrios absolutos de ligamiento (140).

Así pues, los sujetos portadores del alelo rs7041G en homocigosis solo expresan Gc1S y los portadores del alelo rs7041T en homocigosis pueden expresar Gc1F, Gc2 o ambas, dependiendo de qué genotipo rs4588CA tengan. La isoforma Gc1F es la que mayor afinidad tiene por la vitamina D, la Gc1s tiene una afinidad intermedia y es la Gc2 la que tiene menor afinidad (141).

La segunda función plenamente identificada de la DBP es la retirada de ácidos grasos y actina para su degradación posterior. Pero además la DBP interviene en la regulación de la cascada inflamatoria actuando como coadyuvante del péptido C5a, que es un quimioatractor de gran potencia (142) y, al retirar los residuos de actina procedentes de la degradación celular, reduce los efectos proinflamatorios de este desecho celular (143). Estos efectos inmunomoduladores son inversamente proporcionales a la carga de vitamina D que transporte la DBP (144) y por lo tanto pueden depender del fenotipo Gc determinado por las variantes genéticas antes

descritas. Esto explica el interés que ha despertado el estudio del polimorfismo del gen *Gc/DBP* en numerosas enfermedades de base inflamatoria o degenerativa (138).

Los valores de DBP en la HCC, como proteína de síntesis hepática, presentan una relación inversa con el grado de progresión de la enfermedad (145). Respecto a sus diferentes SNP, existe escasa literatura sobre su influencia en la HCC. Falleti *et al.* incluyeron este polimorfismo como marcador de respuesta al tratamiento con INF pegilado y ribavirina, si bien no se identificaron las diferentes isoformas de la DBP y se analizaban de forma conjunta con otros polimorfismos, por lo que no es posible extraer conclusiones (146).

En este estudio hemos identificado los dos SNP del alelo 11 del gen *Gc* y mediante el programa PHASE de identificación fenotípica hemos identificado las isoformas de la proteína *Gc*, de modo que podemos inferir todos los fenotipos a partir de los genotipos.

### **3.- ASPECTOS INMUNOLÓGICOS E INFLAMATORIOS DE LA HCC:**

#### **3.1.- Respuesta inmune a la infección por VHC:**

La **inmunidad innata** es la primera línea de defensa contra la infección por el VHC. Tras la entrada viral en la célula, el hepatocito genera interferón tipo 1 (IFN-1) que activa células *Natural Killer* (NK) y macrófagos tisulares (células de Kupffer) y células dendríticas (CD). Éstas serán las responsables de la citólisis de los hepatocitos infectados mediante la secreción de citocinas, factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e interferón gamma (IFN $\gamma$ ) (147). Además las NK activadas inducen la acción de la inmunidad adaptativa atrayendo linfocitos T activados específicos frente al VHC (148).

A su vez, en el citoplasma de la célula infectada, tiene lugar el reconocimiento de estructuras moleculares asociadas a patógeno (PAMPs) de la región 3'UTR del ARN viral por receptores *toll-like* (TLRs) y receptores inducibles por el ácido retinoico. Esto conlleva a la síntesis de IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  (149) y de forma secundaria a la activación del NF $\kappa$ B, fundamental en la activación de la inmunidad celular (147).

Después de la entrada y la replicación, moléculas virales se asocian a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y son transportadas a la membrana

celular. Esto desencadena la **inmunidad adaptativa**, ya que son reconocidas por células T, especialmente CD8+, que eliminan las células infectadas (150).

En otra vía de activación inmunológica, la destrucción de hepatocitos produce fragmentos de VHC que son captados por CD y drenados en los ganglios linfáticos. Las CD maduras activan la expresión de moléculas MHC tipo 2 para la génesis de células T *helper* antígeno-específicas (Th) (151,152). Esto forma parte de la respuesta inmunológica Th1 que cada vez parece tener un papel más relevante en la posibilidad del aclaramiento de la infección por VHC (153).

Existen diferentes mecanismos de **escape viral a la inmunidad humana**. No solo la variabilidad genética de VHC dificulta la producción de una respuesta específica al mismo (154), sino que varios experimentos *in vitro* han demostrado que el virus es capaz de inhibir la respuesta inmunitaria. Las proteínas no estructurales del VHC, NS3 y NS4A, tienen la capacidad de unirse a la región promotora de la síntesis de IFN- $\beta$  (140). La proteína del core, la proteína cápside E1 y NS3 inhiben también la maduración de las CD suprimiendo su función en la activación de la inmunidad celular (155).

Estudios recientes han postulado que para que la infección por VHC persista, ha de existir un **desequilibrio en la respuesta inmunitaria**. La presencia de una respuesta tipo Th1 favorece la eliminación del virus mediante la presencia de interleucina 2 (IL2) y de IFN $\gamma$ . Sin embargo, una respuesta Th2 con citocinas como la interleucina 4 (IL4) o la 10 (IL10), provocan una mayor tendencia a la cronicidad (153). Los resultados hasta ahora obtenidos no son del todo concluyentes, si bien todo parece indicar que una respuesta Th1 mantenida es fundamental para la desaparición de la infección (156,157). Además, en pacientes con HCC se encuentra mayor cantidad de linfocitos T reguladores CD4+CD25+. Estas células son capaces de suprimir la actividad de los linfocitos CD8+, la proliferación de CD4+ y la síntesis de IFN $\gamma$  (158).

### **3.2.- Proteína transportadora de lipopolisacáridos y HCC:**

La traslocación bacteriana consiste en el paso de productos de origen microbiano con capacidad inmunoestimulante desde la luz intestinal a la sangre portal debido a factores tales como el sobrecrecimiento bacteriano o el edema de la mucosa intestinal.



El mejor conocido de ellos es el lipopolisacárido intestinal (LPS), que es una endotoxina liberada fundamentalmente por las bacterias aerobias gram negativas de la microbiota.

El LPS se une en la sangre a una proteína transportadora, la proteína transportadora de lipopolisacárido (LBP: *liposaccharyde-binding protein*). Ésta se sintetiza principalmente en el hígado promovida por la presencia de LPS y de citocinas proinflamatorias como la IL6 (159). La LBP facilita la unión del LPS a CD14, tanto circulante como ligado a la membrana. Ambos, indistintamente, ceden el LPS al complejo MD-1/TLR4 (160) y éste activa el factor NF- $\kappa$ B, que desencadena una respuesta inflamatoria a través de la liberación de otras citocinas como TNF $\alpha$ , interleucinas 6 (IL6) y 8 (IL8) y factor de crecimiento tisular  $\beta$  (TGF $\beta$ ) (161). Los TLR4 juegan un papel fundamental en la activación de la inmunidad innata frente a la endotoxina bacteriana traslocada en muchas patologías, entre ellas en la infección crónica por VHC.

Existe una relación directa entre la determinación sérica de LBP y la cantidad de LPS en sangre (162) si bien, altas concentraciones de la primera producen una inhibición de la traslocación bacteriana por mecanismos aún no totalmente esclarecidos pero que parecen estar relacionados con la puesta en marcha de la respuesta inmunológica (163).

Se han detectado niveles plasmáticos elevados de LBP en pacientes con hepatitis crónica de diferentes etiologías (164–167). Se han relacionado valores más altos de LBP con la presencia de estadios de fibrosis hepática avanzada, así como con datos de insuficiencia hepática como la actividad de protrombina (168).

### **3.3.- Interleucina 6 y HCC:**

La IL6 es una citocina pleiotrópica producida por una amplia variedad de tipos celulares, como macrófagos, linfocitos B y T y fibroblastos. Interviene en la regulación de varios procesos celulares, incluyendo la proliferación y la diferenciación y juega un papel fundamental en la respuesta de fase aguda y en el equilibrio entre procesos pro y antiinflamatorios (169). Está muy involucrada en el desarrollo de la respuesta inflamatoria desencadenada por la infección crónica por VHC, en la que se han detectado niveles elevados en comparación con sujetos sanos (170,171).

La IL6 aumentada en la HCC puede proceder tanto del hígado como del tejido adiposo (172–174). No se conocen por completo los estímulos para la síntesis y

liberación de IL6, pero en el caso de la infección crónica por VHC se ha propuesto un mecanismo bastante específico. El estímulo por el LPS bacteriano traslocado en la pared intestinal a la sangre portal, según se ha revisado en el apartado anterior, favorece la liberación por las células de Kupffer de  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{TGF}\beta$ , IL6 e IL8 entre otros mediadores proinflamatorios y profibrogénicos.

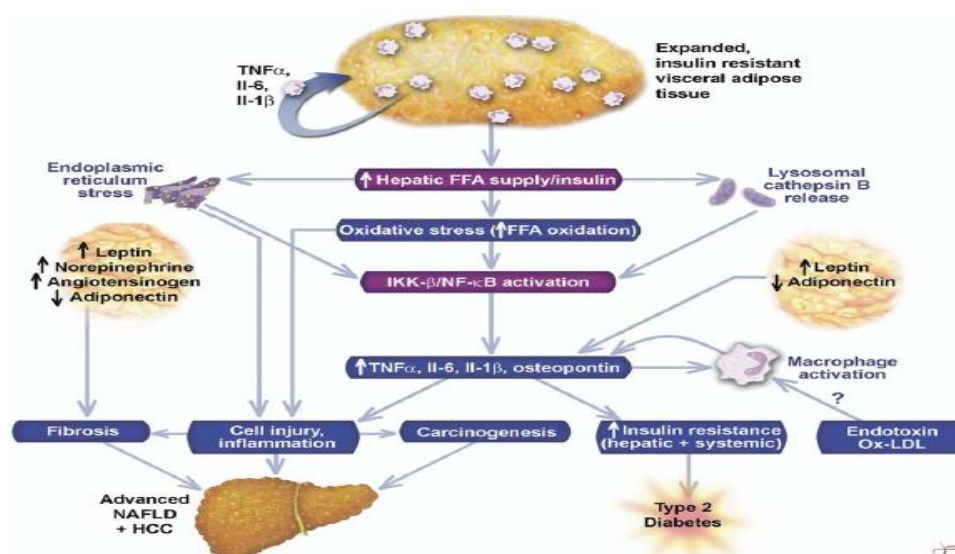
Existe una relación directa entre la concentración plasmática de IL6 y el sobrepeso o la obesidad en la HCC (175). La obesidad induce una inflamación de bajo grado y está directamente relacionada con el síndrome metabólico y la RI, factores ambos claramente relacionados con una evolución desfavorable de la HCC como se señala en otra parte de este estudio. A su vez, la IL6, junto con el  $\text{TNF}\alpha$  inhiben la señal de la insulina y agravan la RI (176).

Por lo tanto, se puede considerar que el incremento de IL6 en la sangre de enfermos con infección crónica por VHC no es solo un marcador inflamatorio, como la proteína C reactiva o la ferritina, sino que puede jugar un papel patogénico activo en la inducción de RI, lo que obliga a incluirla en un estudio como el presente, que trata de correlacionar aspectos nutricionales, metabólicos e inflamatorios en la infección crónica por VHC.

#### **4.- ESTEATOSIS HEPÁTICA EN LA HCC:**

Se define como EH la acumulación de gotas lipídicas compuestas por triglicéridos en el hígado. Este depósito es secundario a diferentes entidades, aunque tiene una relación muy estrecha con el síndrome metabólico. El aumento de los ácidos grasos libres circulantes produce a nivel hepático la activación del sistema  $\text{NF-}\kappa\beta$  que se asocia con la liberación de citocinas proinflamatorias como el  $\text{TNF}\alpha$  o la IL6. Por tanto, la EH se asocia a un aumento del estrés oxidativo, la inflamación y la fibrogénesis hepática por varios mecanismos (177). (Figura 5)

Figura 5: Relación patogénica entre obesidad, EH y RI. De Day CP. From fat to inflammation. Gastroenterology. 2006 ;130(1):207–10 (178).



#### 4.1.- Valoración de la esteatosis hepática:

El aumento en los últimos años de la prevalencia del síndrome metabólico ha conllevado a que, en la actualidad, la enfermedad hepática más frecuente sea la EH. Su diagnóstico se ha convertido en un asunto de vital importancia en la práctica clínica habitual.

Los métodos de imagen que se emplean en este ámbito son principalmente la **ecografía abdominal** y la tomografía axial computarizada (TC). El primero de ellos es una técnica no invasiva e inofensiva para el paciente. Aunque su sensibilidad en el diagnóstico para la EH leve es baja según determinadas series (20-30%) (179,180), en otras series se eleva hasta el 87%(181). Su inocuidad para el paciente y su sencillez hace de la ECO la herramienta deseada para el diagnóstico para la EH, por eso en los últimos años se han añadido sistemas de elastografía para aumentar su sensibilidad y especificidad que aún están en desarrollo (182). La **tomografía axial computarizada** permite la cuantificación de grasa hepática mediante la comparación con el parénquima esplénico, sin embargo, la sensibilidad no es alta y produce la radiación del paciente, por lo que no es una técnica recomendada en la actualidad (183). En los últimos años, ha surgido la **espectrometría por resonancia magnética** como técnica de imagen que permite no solo valorar sino cuantificar el acúmulo de triglicéridos en el tejido hepático.

Existen pocos estudios que comparen los resultados de ella tomando como *gold standard* la biopsia hepática, y los que existen, incluyen un número escaso de pacientes. Los resultados obtenidos muestran unas correlaciones muy prometedoras (184) que abren la aplicación de la resonancia ya no solo al diagnóstico de la EH sino también a su seguimiento y a la valoración de las medidas terapéuticas administradas. Su elevado coste y su escasa disponibilidad actual hacen que por el momento esta técnica no esté más extendida (185).

Como es el caso de la valoración de la fibrosis, en la EH también han surgido diferentes **índices indirectos** para el diagnóstico de la EH. Entre todos ellos, el *Hepatic steatosis index* presenta unos prometedores resultados con una sensibilidad del 93% y una especificidad del 92%. Se trata de una combinación de los niveles de AST y ALT, el IMC y la presencia de diabetes mellitus (186). Sin embargo, la determinación de EH que se toma como *gold standard* en este estudio no es la biopsia hepática si no la ECO. Existe otro test indirecto francés, Steatotest®, que sí compara los resultados con la biopsia hepática y que tiene resultados igual de prometedores. Se trata de una combinación de 12 parámetros en una fórmula patentada (187).

#### **4.2.- Esteatosis hepática en la HCC:**

La EH está frecuentemente asociada a la infección por VHC. Se estima que en un 50% de los pacientes con HCC se puede encontrar un acúmulo graso aumentado en tejido hepático y éste, a su vez, marca un factor de mal pronóstico en la progresión de la fibrosis y en la aparición de CHC (188).

Se considera que el VHC aumenta la síntesis de estos acúmulos grasos mediante la activación de proteínas de unión al elemento de respuesta a esteroides (SREBPs) que son factores de transcripción relacionados en la lipogénesis (189). Se produce también una secreción insuficiente de lípidos al exterior de los hepatocitos por un déficit de apolipoproteína B (190) y una degradación disminuida de ácidos grasos por la inhibición de la expresión del receptor peroxisomal PPAR $\alpha$  (191). Esto conduce a una concentración sérica disminuida de colesterol y triglicéridos. Varios estudios señalan a la proteína del core del VHC como responsable de estos mecanismos e incluso se ha postulado la necesidad de cierto procesamiento de la misma por elementos celulares para llevar a cabo este efecto (192,193). Esta afectación es más intensa en el VHC

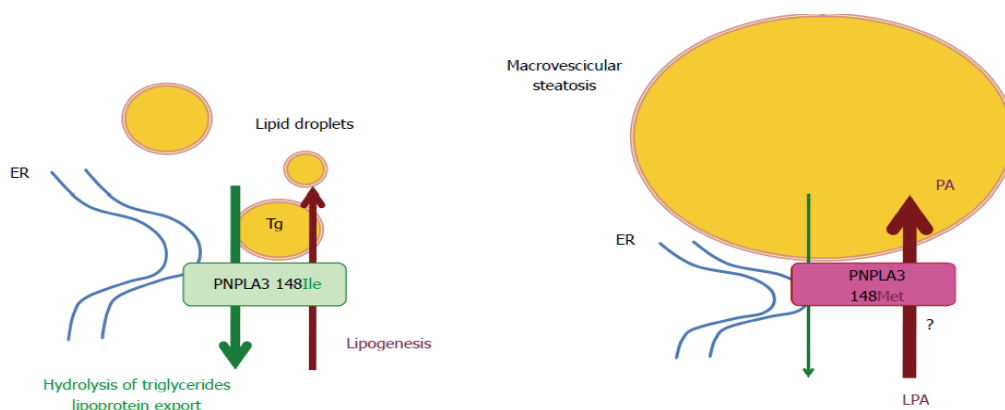
genotipo 3, el más relacionado con la EH, con una mayor expresión de SREBPs, y menos actividad de PPAR $\alpha$  (194).

#### 4.3.- Polimorfismo *PNPLA3* y HCC:

En el año 2008, Romeo *et al.* realizaron un estudio en 2121 pacientes incluidos en el *Dallas Heart Study* en los que se había detectado EH por resonancia magnética. Identificaron un SNP en la posición 148 del gen *patatin like phospholipasa 3 (PNPLA3)* denominado rs738409C/G que genera un cambio de isoleucina por metionina en dicha proteína, también llamado 148M por la posición del cambio del aminoácido. La presencia del alelo mutado G en homo o heterocigosis se asociaba a mayor cantidad de grasa y con la probabilidad de esteatohepatitis, con un efecto dosis-gen (195).

La proteína *PNPLA3 wild type*, también llamada adiponutrina, se sitúa en la membrana intracelular de los hepatocitos y tiene actividad lipolítica frente a los triglicéridos. La mutación 148M disminuye este efecto por lo que favorece la aparición de EH macrovesicular (196,197). Además, es posible que origine una actividad lipogénica que agravaría este efecto (198). (Figura 6)

Figura 6: Mecanismo de EH por la mutación 148M de *PNPLA3*. De Dongiovanni P. *PNPLA3 I148M polymorphism and progressive liver disease*. World J Gastroenterol. 2013;19(41):6969.(199)



Una vez establecido que el polimorfismo *PNPLA3* es un factor patogénico en la evolución desfavorable de la EH, se planteó su posible influencia en otras enfermedades hepáticas en las que el depósito graso adquiere un papel importante. La HCC fue la primera candidata y en los últimos años se han desarrollado varios estudios que

relacionan la presencia de EH (200,201) y estadios avanzados de fibrosis en pacientes infectados por VHC genotipo no 3 (201–203). (Tabla 2).

**Tabla 2:** Estudios de la mutación 148M y la fibrosis en HCC.

ESTUDIO	DISEÑO	N	MEDIDA	OR	IC 95%
<b>Valenti <i>et al.</i> (201)</b>	Transversal	819	Cirrosis	1,5	1,2-1,9
<b>Müller <i>et al.</i> (202)</b>	Transversal	605	Cirrosis	2,8	1,2-6,2
<b>Trépo <i>et al.</i> (203)</b>	Transversal	537	Estadio	3,1	1,5-6,5
			Progresión	2,6	1,2-5,7

En el último año, Ampuero *et al.* (204) realizaron un estudio multicéntrico en España con 474 pacientes con HCC que muestra la asociación del alelo G tanto en homo como en heterocigosis con la mayor frecuencia de EH en sujetos infectados por VHC genotipo no 3 (52,4% vs 33%,  $p=0,0001$ ). Esta relación se daba en sujetos portadores del alelo *IL28B* T pero no en aquellos *IL28B* CC, como ya había sido reseñado anteriormente por Valenti *et al.* en 2012 (205). Por el contrario, el grupo español no encuentra influencia de la mutación 148M de *PNPLA3* sobre la cirrosis ni sobre la tasa de respuesta viral sostenida, datos que contradicen los hallados en el estudio italiano.

Por último, cabe señalar que la presencia del alelo G de *PNPLA3* también se ha relacionado con el riesgo de desarrollar CHC en la cirrosis alcohólica (206,207), aunque los resultados son contradictorios en el caso de la HCC (208).

## 5.- RESISTENCIA A LA INSULINA EN LA HCC:

### 5.1.- Resistencia a la insulina:

La insulina es una hormona sintetizada inicialmente como un polipéptido precursor de 86 aminoácidos por el tejido pancreático. Posteriormente, el procesamiento proteolítico de éste genera el péptido C y las dos cadenas que componen la insulina. Se trata de la hormona anabólica por excelencia, inhibe la síntesis de glucosa

en el hígado, promueve la captación y utilización de la misma en los tejidos periféricos y su almacenamiento en forma de depósitos de glucógeno (209).

La vía de señalización de la insulina incluye a los receptores IRS-1 e IRS-2 y a varias enzimas kinasas como la protein-kinasa Akt o la fosfatidilinositol-3-kinasa. La activación de éstas promueve el almacenamiento del exceso de glucosa como glucógeno al activar la enzima glucógeno sintetasa y produce también la traslocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) a la membrana plasmática de la células, promoviendo la llegada de la glucosa al tejido periférico, adiposo y muscular (210).

El desarrollo de RI es uno de los problemas de salud más prevalentes en la actualidad (211). Su relación con la mayor presencia de obesidad en la población es evidente. El aumento de depósito de ácidos grasos y triglicéridos en los tejidos genera, a través de la síntesis en los adipocitos de citocinas como la leptina, la resistina, el TNF $\alpha$  y la adiponectina, una corriente inhibitoria de la acción de la insulina (209). La célula  $\beta$  pancreática compensa el déficit de acción generando mayores cantidades de insulina plasmática que induce a su vez un estado proinflamatorio con aumento de síntesis de TNF $\alpha$ , IL-6, NF- $\kappa$  $\beta$  y otras citocinas (212). La menor utilización periférica de la insulina y la mayor síntesis hepática de glucosa conducen de forma progresiva diabetes mellitus tipo 2 (209).

## **5.2.- Resistencia a la insulina e inflamación:**

Existe un círculo vicioso entre obesidad, RI e inflamación, base del conocido síndrome metabólico. En él tienen un papel fundamental los macrófagos tisulares. Pueden diferenciarse en dos formas, los macrófagos M2 que sintetizan citocinas antiinflamatorias como IL-10 (212), y los macrófagos M1 que tienen un papel proinflamatorio, produciendo TNF $\alpha$ , IL6 y óxido nítrico entre otros (213). En la obesidad, con el aumento de la oxidación de ácidos grasos, se produce un mayor reclutamiento y diferenciación de estos macrófagos hacia M1 (214).

Como ya se ha señalado anteriormente, el acúmulo de tejido adiposo favorece la secreción de citocinas, aumenta la cantidad de ácidos grasos saturados y el estrés oxidativo. Se ha demostrado a su vez, que dietas ricas en grasa y azúcares, promotoras del síndrome metabólico, favorecen el cambio de la microbiota intestinal y aumentan la

traslocación bacteriana con niveles de LPS séricos más altos (215). El LPS y otras PAMPs activan, entre otros, a los receptores TLR4 (216). Todos estos mecanismos producen la fosforilación y activación de dos vías proinflamatorias importantes, NFκβ e IKKβ, que son la clave para la transcripción de las citocinas proinflamatorias secretadas por los macrófagos M1: TNFα, IL6, IL-1β (212,217).

Las señales proinflamatorias interfieren con la acción de la insulina a nivel pre y postranscripcional. Tanto IKKβ como NFκβ regulan la expresión de múltiples genes partícipes en la sensibilidad a la insulina como GLUT4 o IRS-1 (218,219). A su vez, la inflamación favorece la aparición de productos metabólicos como los ácidos grasos que favorecen la RI (220). Se han observado niveles altos de TNFα e IL6 en pacientes con RI a nivel periférico, en hígado y músculo, y en estudios prospectivos se ha relacionado estos marcadores inflamatorios con el riesgo de desarrollar la enfermedad (221).

### **5.3.- Resistencia a la insulina y cistatina C:**

La cistatina C es una proteína no glicosilada de bajo peso molecular que tiene actividad inhibidora de proteasas de cisteína (222). Se produce a tasa constante en todas las células nucleadas y se elimina por filtración glomerular, siendo reabsorbida en su totalidad en el túbulo proximal y degradada por las células de su revestimiento.

La concentración sérica de cistatina C es independiente del sexo, la edad y la masa muscular y no se ve influida por la bilirrubinemia, la presencia de neoplasias o de procesos inflamatorios (223,224), proporcionando un método alternativo para la medición del filtrado glomerular, incluso en enfermos con hepatopatía crónica.

Dos estudios preliminares sugirieron que la determinación de cistatina C en suero podría ser un criterio de valoración de la fibrosis hepática en diversas hepatopatías crónicas (225,226). Sin embargo, un estudio posterior de nuestro grupo no confirmó esta posibilidad, ya que la cistatina C se elevaba entre los estadios 1 y 2, para estabilizarse en los estadios 3 y 4 (227).

Paralelamente, otros estudios señalaron que la cistatina C se eleva en pacientes con síndrome metabólico (228–231), y es predictiva del riesgo cardiovascular en estos enfermos (232).



En este estudio hemos incluido la determinación de cistatina C como posible marcador de RI en pacientes con infección crónica por VHC.

#### 5.4.- Valoración de la resistencia a la insulina:

La valoración de la RI se puede realizar mediante métodos directos o indirectos. Los primeros engloban técnicas laboriosas y caras, por lo que no están indicados para realizar estudios en poblaciones (233). Entre los métodos indirectos destaca el uso del *Homeostasis model assesment* (HOMA). Descrito por Matthews *et al.* en 1985 (234), se trata de un modelo matemático que incluye la concentración sérica de glucosa y de insulina en ayunas y las relaciona según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Glucosa basal (mg/dl)} \times \text{Insulina basal (\mu UI/ml)}}{405}$$

Este índice ha sido ampliamente utilizado en diferentes estudios y ha demostrado una buena correlación con los métodos directos de medición de resistencia insulínica como los *clamps* o pinzas eu o hiperglucémicas, considerados el *gold standard* ( $r=0,88$  y  $r=0,87$ ;  $p<0,001$ ) (235).

Aunque se trata de un método fiable y fácil de aplicar en la valoración de la RI, tiene varias limitaciones. Se calcula mediante la extracción de una sola muestra de sangre, mientras que la secreción de insulina es pulsátil, por lo que los resultados no se ajustan totalmente a la situación real, además existen diferentes medios para determinar la insulina sérica y sus resultados pueden no ser comparables (236). Los valores de HOMA se ven influidos por el sexo y la edad del paciente (237).

Otro de los problemas de la aplicabilidad del HOMA es la determinación de un punto de corte óptimo. En una serie española de 13000 pacientes, se establece que el percentil 75 de HOMA es de 2,48 y el percentil 90 es de 3,46; por lo que, teniendo en cuenta que la prevalencia de la resistencia insulínica en nuestra población es de un 20% (238), consideramos que el punto de corte óptimo para definirla es de 3 (237).

### 5.5.- Resistencia a la insulina en la HCC:

La RI es más frecuente en la HCC que en hepatopatías crónicas de otras etiologías (239). El VHC produce una inhibición de la cascada de señalización de la insulina mediante diferentes mecanismos.

En primer lugar, se ha objetivado en estudios *in vitro* que la activación basal de la kinasa Akt está aumentada por la expresión de proteínas virales, mecanismo que promueve la supervivencia de células infectadas. Se cree que, *in vivo*, este hallazgo manifiesta una menor capacidad de respuesta a la acción de la insulina de las células infectadas (240,241).

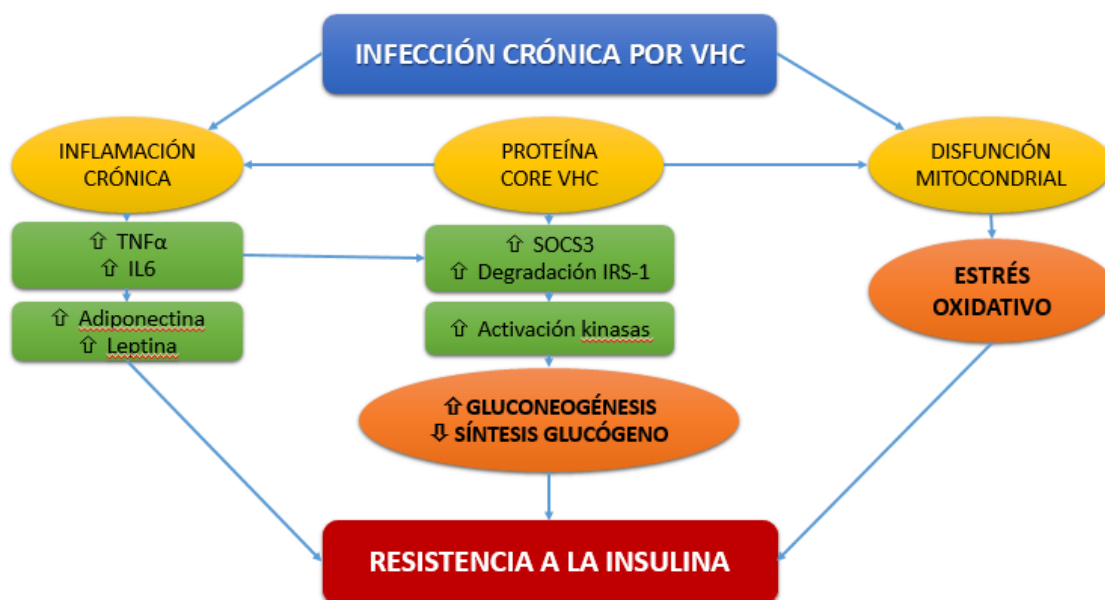
Bernsmeier *et al.* demostraron que el VHC induce la activación de la proteína-fosfatasa 2 hepática. Ésta interfiere con la fosforilización y, por tanto, con la activación de diferentes elementos fundamentales para la acción insulínica como las kinasas Akt y PI3K o el IRS-1, entre otros (242). Además se ha visto recientemente que la proteína-fosfatasa 2 hepática inhibe también la kinasa del adenosinmonofosfato, paso necesario para la replicación viral y posible objetivo de terapias anti-VHC (243).

La proteína core del VHC se ha relacionado con una degradación aumentada de IRS-1 e IRS-2 por aumento del supresor de señalización de citocinas 3 (SOCS3)(244). Se ha descrito que esta acción se produce por mecanismos diferentes según el genotipo viral (245). Además, la proteína core produce daño mitocondrial mediante el aumento del estrés oxidativo y de sustancias oxidantes que favorecen tanto la RI como la aparición de EH (246,247).

Por último, no debemos olvidar que de forma concomitante la presencia de citocinas proinflamatorias promovidas por el VHC, como el TNF $\alpha$  e IL6 conduce a la fosforilación e inactivación del IRS-1(248).

Todos estos mecanismo interrelacionados, producen una mayor frecuencia de RI en pacientes con HCC.(Figura7).

**Figura 7:** Mecanismos moleculares que median en la resistencia a la insulina asociada a la HCC. Adaptado de *Hung C-H y Col.* Hepatitis C virus-associated insulin resistance: pathogenic mechanisms and clinical implications. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011;9(5):525–33.(249)



Las consecuencias clínicas de esta relación están bien descritas. En un primer lugar, la RI ha sido descrita como un factor predictor independiente de fibrosis hepática (239). La insulina modula la síntesis de óxido nítrico, endotelina, TNF $\alpha$  y factores de crecimiento del tejido conectivo. Todo esto activa a las células estrelladas hepáticas y puede contribuir al desarrollo de hipertensión portal (250).

Los pacientes con HCC y RI presentan, como es el caso de la presencia de EH, menores tasas de respuesta exitosa a la terapia con interferón pegilado y ribavirina (251–253). Además, se ha descrito una relación entre los diferentes genotipos de *IL28B* y la presencia de RI. El genotipo CC se asocia a menores tasas de RI frente a los CT y TT. El mecanismo patogénico no está establecido, se cree que pudiera deberse a una menor expresión de los genes estimulados por el IFN $\alpha$  en los pacientes CC, si bien, esto parece tener mayor relevancia en el caso de la EH que en la RI (254).

Existen datos que apoyan que la presencia de diabetes mellitus tipo 2 es un factor de riesgo para desarrollar CHC en diferentes hepatopatías incluyendo la HCC (255–257).

Veldt *et al.* describieron una frecuencia 5 veces mayor de CHC en pacientes con HCC y diabetes mellitus que en pacientes no diabéticos (258). De esta forma, se ha relacionado la RI con la presencia de una amplia variedad de procesos cancerosos, como el mamario, el cáncer colorrectal, el de esófago y el de riñón, entre otros(259). Se considera factible que la hiperinsulinemia secundaria a la RI favorece la síntesis de factores de crecimiento *insulin-like* que estimulan la proliferación e inhiben la apoptosis celular, favoreciendo el proceso de carcinogénesis (260).

Cabe destacar que la RI también parece tener un papel en las manifestaciones extrahepáticas de la HCC, con cifras mayores de insulina basal en pacientes con estas dolencias (261). Además, es bien conocido que tanto la diabetes mellitus como la existencia de RI son factores de riesgo para la progresión de la fibrosis después de un trasplante hepático por HCC (262).

## 6.- FIBROSIS HEPÁTICA EN LA HCC:

### 6.1.-Fibrogénesis

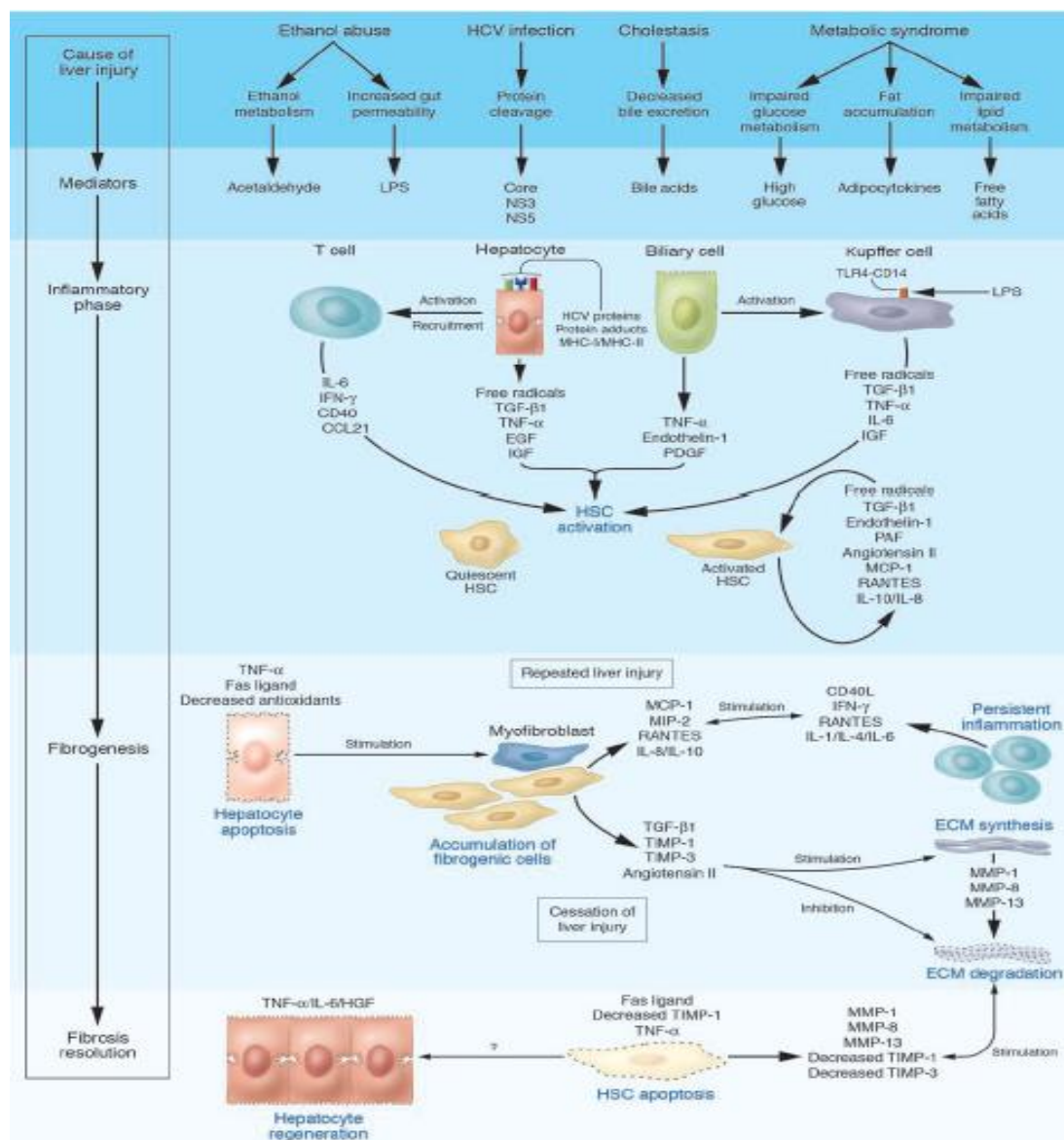
La fibrosis hepática es el resultado del daño crónico tisular. Los mecanismos por los que histológicamente se llega a esta situación no son del todo conocidos, si bien se conoce que la principal responsable es la **célula estrellada hepática** (CEH). Se trata de una célula quiescente localizada en el espacio de Disse que se transforma en un miofibroblasto proliferativo. Éste sintetiza de forma aumentada matriz extracelular que altera la arquitectura hepática (263).

La activación de las CEHs está estrechamente ligada a la respuesta inmune que produce el daño hepático. Ambas están reguladas por la acción de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas(264). El factor de crecimiento derivado de las plaquetas, el TGF $\beta$  y el TNF $\alpha$  son mediadores profibróticos (263) ya que estimulan la síntesis de colágeno y la proliferación de las CEH. Otras vías de activación son la leptina (265), la IL10 y la IL8 , que produce la liberación de TGF  $\beta$  por las células Kupffer(266).

Además, la CEH secreta a su vez mediadores inmunológicos que reclutan linfocitos y monocitos. De esta forma, se mantiene la cadena inflamatoria, existiendo un *feedback* positivo entre inflamación y fibrosis (267).

Respecto a los mecanismos propiamente asociados a la infección por el VHC, se considera que los productos del estrés oxidativo producidos en los hepatocitos dañados transforman la CEH en miofibroblasto (268). Existe evidencia también de que proteínas del VHC estructurales y no estructurales pueden estimular a la CEH de forma directa (269). Por otro lado, no debemos olvidar que la HCC favorece la aparición de trastornos metabólicos que favorecen por otra vía la fibrogénesis hepática.

**Figura 8: Proceso de fibrogénesis hepática.** De *Bataller R y Col. Liver fibrosis. J Clin Invest.* 2005 Feb 1;115(2):209–18.(270)



## 6.2.- Valoración de la fibrosis hepática

La valoración de la lesión hepática en la HCC es de vital importancia. La determinación y la graduación de la fibrosis marcan el pronóstico de la enfermedad y, en la actualidad, delimita también el tratamiento a administrar.

Durante los últimos 50 años el *gold standard* para el estudio de la fibrosis hepática ha sido la **biopsia hepática** (271). Se trata de una prueba invasiva con un escaso número de complicaciones (0,57%), y una ínfima tasa de mortalidad (0,009-0,12%) (272). Es la prueba que aporta más información sobre la lesión del hígado, ya que permite identificar la presencia de inflamación, necrosis, EH y el depósito de oligoelementos además de la fibrosis.

En el caso de la HCC, la lesión más frecuentemente encontrada es la existencia de un infiltrado inflamatorio (fundamentalmente población linfocitaria) en los espacios porta y en el parénquima periportal, asociada a una necrosis más o menos extensa de los hepatocitos de la membrana limitante (hepatitis de la interfase) con aparición de diferentes grados de fibrosis.

El **índice de Knodell** o índice de actividad histológica es una escala numérica compuesta por cuatro cifras que valora la necrosis periportal o en puentes, la necrosis focal o la degeneración intralobular, la inflamación y la fibrosis (273).

En la actualidad, la escala histológica más utilizada en la evaluación de una biopsia hepática es la **escala METAVIR**, diseñada específicamente para la HCC en 1996. En ella, se valora la fibrosis (F) y la actividad, compuesta por la necrosis lobulillar y necrosis erosiva (A), de manera independiente (Tabla 3) (274).

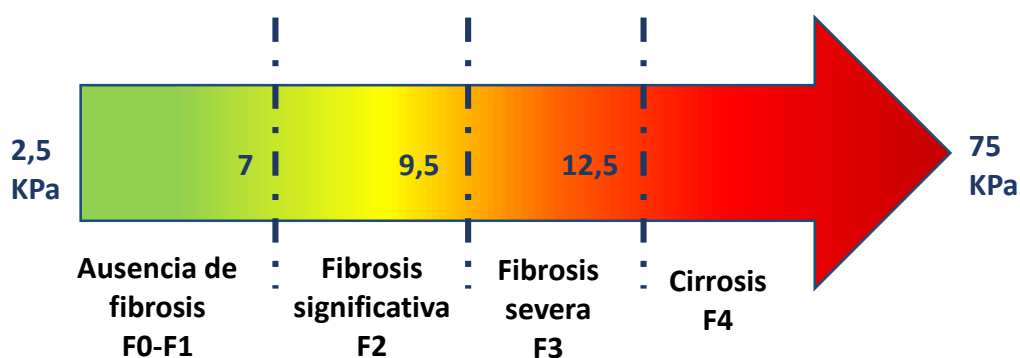
La biopsia hepática no está exenta de limitaciones. En condiciones normales, la lesión se distribuye de forma heterogénea por lo que la muestra solo nos permite valorar un fragmento muy pequeño de tejido (mínimo 2 cm). Esto, junto con la variabilidad inter e intraobservador de los hallazgos anatomopatológicos, hace que la discriminación de la fibrosis valorada en una muestra hepática corresponda a la que se obtiene de analizar el hígado entero únicamente en un 65% de los casos, con un AUC de 0,82 (275).

Tabla 3: Escala METAVIR.

NECROSIS EROSIVA	NECROSIS LOBULILLAR	ACTIVIDAD HISTOLÓGICA
0 (Ninguna)	0 (Ninguna o leve)	A0 (Ninguna)
0	1 (Moderada)	A1 (Leve)
0	2 (Grave)	A2 (Moderada)
1 (Leve)	0 o 1	A1
1	2	A2
2 (Moderada)	0 o 1	A2
2	2	A3 (Grave)
3 (Grave)	0, 1 o 2	A3 (Grave)
PUNTUACIÓN FIBROSIS		
F0	Sin fibrosis	
F1	Ampliación del tracto portal pero sin tabiques	
F2	Ampliación del tracto portal con escasos tabiques	
F3	Numerosos tabiques sin cirrosis	
F4	Cirrosis	

En las últimas décadas se han desarrollado diferentes **métodos no invasivos** para la valoración de la fibrosis. El más aceptado de ellos, hasta el momento, es la **elastografía de transición (FibroScan®) (ET)**. Esta técnica mide el estado de rigidez del tejido utilizando una onda de ultrasonidos (5 MHz) y un pulso mecánico de vibración de baja frecuencia (50 Hz) que genera una onda elástica. La velocidad de propagación a nivel intrahepático medida en kilopascales (kPa) será directamente proporcional al grado de fibrosis del hígado. Se trata de un método fiable para la valoración de fibrosis significativa ( $\geq F2$ ), avanzada ( $\geq F3$ ) o cirrosis (F4) con unos valores de AUC de 0,84, 0,89 y 0,94 respectivamente (276). Existen diferencias significativas entre los valores de corte que separan los grados de fibrosis según la causa de la hepatopatía (Figura 9). Sin embargo, la ET tiene diversas limitaciones, ya que puede sobreestimar el grado de fibrosis en los casos de que exista actividad inflamatoria o infiltración grasa en el tejido hepático (277). Además, la tasa de éxito de la técnica depende de la experiencia del observador, la edad y el IMC del paciente y de la anchura de sus espacios intercostales entre otros(278).

**Figura 9: Valores de elastografía transitoria en HCC.** Adaptado de *Castera L y Col. A Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. J Hepatol. 2008 May;48(5):835–47. (279)*



Existen otros medios no invasivos basados en la imagen para la valoración de la fibrosis. El **ARFI (Acoustic radiation force impulse)**, combina la ecografía convencional con la medición de la rigidez hepática de forma localizada. Parece que está menos influido por la presencia de EH que la ET pero sigue en proceso de validación, ya que no discrimina bien los grados intermedios de fibrosis. La **elastografía por resonancia magnética** aporta la posibilidad de valorar el hígado al completo y es capaz de detectar estadios precoces de fibrosis, si bien su elevado coste y las limitaciones de aplicación en pacientes obesos y/o con sobrecarga férrica hepática, no permiten aún establecerla para su uso cotidiano (280).

Se han descrito también **marcadores serológicos de la fibrosis**. Algunos de ellos, denominados **directos**, consisten en la detección de proteínas que intervienen en el proceso de la fibrogenesis. Estos incluyen el TGF- $\beta$ 1, las metaloproteasas, los inhibidores tisulares de metaloproteasas, el factor de crecimiento del tejido conectivo y el ácido hialurónico, entre otros (281). Todos estos parámetros reflejan el recambio que existe de matriz extracelular y están muy asociados a la presencia de inflamación, por lo que es posible que no detecten fibrosis en estados con mínima actividad inflamatoria y viceversa. Además, cabe destacar que no son específicos del hígado y que sus niveles séricos dependen también de su aclaramiento, por lo que no permiten sacar conclusiones de forma aislada del estado de fibrosis del hígado (282).

Por último, existen también **biomarcadores indirectos de la fibrosis**. Son combinaciones matemáticas de diferentes parámetros analíticos y datos del paciente que permiten estimar el estadio de la enfermedad (Tabla 4). De forma general son



fiables para diferenciar fases precoces de avanzadas, si bien, no son capaces de detectar diferencias entre estadios contiguos. En los últimos años, se ha postulado la utilidad de estos índices si son utilizados en combinación, bien entre ellos, bien con otros métodos de diagnóstico de fibrosis no invasivos (281,283).

**Tabla 4:** Marcadores séricos indirectos de fibrosis hepática. (281)

Índices	Componentes	S (%)	E (%)
<b>AST/ALT</b>	AST, ALT	53	100
<b>APRI</b>	AST/ recuento plaquetario	89	75
<b>Forns</b>	Edad, plaquetas, GGT y colesterol total	78	74
<b>Hepascore</b>	Edad, sexo, bilirrubina total, GGT, ácido hialurónico y Y2-macroglobulina	63	89
<b>FIB-4</b>	Plaquetas, ALT, AST, edad	70	74
<b>FibroIndex</b>	Plaquetas, ALT, GGT	78	74
<b>Fibrotest</b>	$\alpha$ 2-macroglobulina, haptoglobina, apolipoproteína A1, GGT, bilirrubina, edad y sexo.	81	84

S: sensibilidad; E: especificidad. Datos obtenidos para estadios de fibrosis avanzada (F4)

## **7.- NUTRICIÓN, METABOLISMO, GENÉTICA E INFLAMACIÓN: INFLUENCIA EN LA EVOLUCIÓN DE LA HCC.**

Incluso en las fases tempranas de la infección crónica por VHC, el virus influye directa o indirectamente sobre determinados procesos metabólicos, especialmente de los lípidos en el hígado y de la respuesta a la insulina en el hígado y el tejido adiposo, lo que puede repercutir sobre el contenido y la distribución de la grasa corporal, sobre el metabolismo energético y, como se verá más adelante, sobre el estado proinflamatorio propio de la infección. A su vez, una alteración de la composición corporal y determinadas deficiencias nutricionales específicas que agravan la repercusión negativa del trastorno general sobre procesos metabólicos esenciales puede facilitar la progresión del daño hepático inducido, directa o indirectamente, por la infección crónica por VHC.

El planteamiento inicial de este estudio se centraba solo en esta cuestión, pero en las fases iniciales de su desarrollo pudimos comprobar que existe un vínculo muy estrecho entre las alteraciones del estado nutricional y los factores metabólicos, genéticos e inflamatorios que influyen sobre la evolución de la hepatopatía, lo que nos dio la oportunidad de modificar su diseño sin perder su carácter prospectivo. La principal dificultad en el planteamiento final de este estudio residió en que los conocimientos existentes sobre los distintos aspectos finalmente considerados ocupaban compartimentos estancos dentro de la bibliografía revisada, que describe hallazgos aislados pero no los integra en un cuerpo fisiopatológico común. Este esfuerzo de integración y la identificación de nuevos factores es la justificación fundamental de nuestro estudio.



## **II.- HIPÓTESIS**



## II.- HIPÓTESIS

El comportamiento lesional y evolutivo de la infección crónica por el virus de la hepatitis C es muy variable y depende de la actuación de un complejo de factores que modulan la respuesta inmune frente al virus, los mecanismos de inflamación y la progresión de la fibrosis. Entre estos factores tienen gran relevancia el estado nutricional global, la disponibilidad de determinados micronutrientes, el desequilibrio metabólico inducido por la RI y las causas de ésta, el tipo y la intensidad de la respuesta inflamatoria, todo ello bajo la influencia de determinados polimorfismos genéticos. Los estudios por separado de todos estos factores aportan múltiples enfoques parciales y solapados, sin claras evidencias de relación causa-efecto.

El esclarecimiento de las múltiples interacciones entre estos factores y la identificación de los que juegan un papel protagonista en la regulación global de la respuesta del organismo frente al virus resulta determinante para tener una visión integrada de la interacción virus-huésped que ayude a identificar los nodos patogénicos en los que se define cómo va a evolucionar la enfermedad en un sujeto dado.



## **III.- OBJETIVOS**





### III.- OBJETIVOS

1. **Objetivos preliminares:** Análisis individualizado de factores con potencial influencia sobre la evolución de la infección crónica por VHC
  - 1.1. Estudio antropométrico de composición corporal mediante bioimpedancia.
  - 1.2. Valoración nutricional basada en la determinación de
    - 1.2.1. Parámetros analíticos generales
    - 1.2.2. Determinación de oligoelementos (Se, Zn, Cu) en plasma.
    - 1.2.3. Estudio de vitaminas A, D y E, sus proteínas transportadoras y polimorfismos genéticos relacionados.
  - 1.3. Valoración del estado inflamatorio sistémico basada en
    - 1.3.1. Reactantes séricos indirectos: ferritina, prealbúmina, ceruloplasmina, etc.
    - 1.3.2. Determinación sérica de LBP y de IL6.
    - 1.3.3. Identificación del genotipo *IL28B* como índice del nivel constitutivo de respuesta inflamatoria.
  - 1.4. Valoración del perfil lipídico del plasma y de su posible modulación por el polimorfismo del gen *PNPLA3*.
  - 1.5. Identificación de esteatosis hepática basada en resultados de biopsia o de ecografía hepáticas.
  - 1.6. Valoración de la sensibilidad a la insulina mediante la determinación del índice HOMA.
  - 1.7. Establecimiento del estadio de fibrosis basada en resultados de biopsia hepática o de elastografía transitoria.

#### 2. **Objetivo principal**

Analizar las relaciones univariadas entre los diferentes elementos reseñados en el punto anterior para identificar cuál de ellos es el que se relaciona con mayor significación y frecuencia con los demás, para introducirlo como variable dependiente en un análisis multivariado integrador que establezca la influencia de los parámetros seleccionados y permita establecer un modelo predictivo.

### 3. Objetivo exploratorio

Dada la gran cantidad de variables incluidas en este estudio, investigar su posible utilidad para mejorar la capacidad predictiva del estadio de fibrosis de modelos basados en criterios no invasivos. Propuesta, si procede, de desarrollo de un nuevo modelo predictivo de fibrosis hepática en la infección crónica por VHC

## **IV.- PACIENTES Y MÉTODOS**



## IV.- PACIENTES Y MÉTODOS

### 1.- DISEÑO DEL ESTUDIO:

#### 1.1.- Tipo y ámbito del estudio:

Se trata de un estudio prospectivo sobre una cohorte abierta de pacientes sin grupo de comparación externo. El período de reclutamiento ha sido de septiembre de 2013 a mayo de 2014.

La recogida de muestras ha sido realizada en la Unidad de Hígado del Servicio de Aparato Digestivo (Prof. Enrique Rey Díaz-Rubio) del Hospital Clínico San Carlos (HCSC) de Madrid.

El HCSC es un hospital terciario, con acreditación para la docencia de pregrado y postgrado, adscrito a la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

#### 1.2.- Descripción de la muestra a estudio:

Se reclutaron un total de 79 pacientes con hepatopatía crónica por VHC (38 varones y 41 mujeres) que cumplieran los siguientes [criterios de inclusión](#):

1. Infección crónica activa (viremia detectable) por VHC en cualquier estadio evolutivo.
2. No tratado previamente o tratado sin obtener respuesta viral sostenida y habiendo finalizado el tratamiento al menos un año antes.
3. Con biopsia hepática o fibroscán en los últimos 3 años.

Se excluyeron aquellos sujetos con cirrosis descompensada, entendida como tal la presencia de ascitis o tratamiento diurético o bien la presencia o los antecedentes de encefalopatía hepática y/o hemorragia digestiva por varices esofágicas.

No fueron incluidos tampoco aquellos pacientes con las siguientes comorbilidades:

- a. Infección concomitante por el virus de la hepatitis B o por el virus de la inmunodeficiencia humana.

- b. Diabetes mellitus que requiriera tratamiento con antidiabéticos orales y/o insulina.
- c. Insuficiencia renal (aclaramiento de creatinina <60 ml/minuto).
- d. Cualquier cardiopatía o neumopatía que requiriera tratamiento salvo hipertensión arterial controlada.
- e. Bebedores activos de > 50 g de etanol/día.

Todos los sujetos seguían controles periódicos de su hepatopatía en las consultas externas de la Unidad de Hígado del Servicio de Aparato Digestivo del HCSC. Dieron su consentimiento según las normas de la Declaración de Helsinki (Apéndice 1). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación Clínica (CEIC) del HCSC de Madrid (Apéndice 2).

En una única visita al centro se obtuvieron las muestras sanguíneas para los exámenes de laboratorio y los datos de la BIA. Las muestras para el estudio genético y para la obtención de las citocinas se extrajeron con la misma punción y se procesaron en las dos horas siguientes a la misma.

Las muestras destinadas al estudio genético se congelaron a -80°C hasta su procesamiento. Del resto, se extrajeron dos alícuotas de suero tras la centrifugación a 2000 g durante 10 minutos en una centrifugadora Labofuge 200® (Heraeus) y se conservaron también a -80°C hasta su respectivo análisis.

Los datos concernientes a la infección por VHC se recogieron de la historia clínica del paciente.

## **2.- ESTUDIO BASAL:**

### **2.1.- Datos demográficos y epidemiológicos:**

Se analizaron la edad, el sexo, la nacionalidad y la etnia como datos demográficos. Se recogieron datos sobre el genotipo y la carga viral, el estadio de la enfermedad y los posibles tratamientos previos.

## 2.2.- Datos antropométricos:

La determinación del peso, de la talla y consecuentemente del IMC se realizó en el Servicio de Endocrinología del HCSC de Madrid. Se realizó en la misma visita una BIA corporal mediante el aparato Bodystat Quadscan 4000 de Sanro. Se trata de una BIA multifrecuencia con cuatro electrodos, dos de ellos actúan como inyectores de corriente en el organismo, y los otros dos son los detectores de la variación que ha experimentado la corriente tras recorrer el organismo. La intensidad de la corriente aplicada fue de 0,8 miliamperios (imperceptible por el paciente) y las frecuencias de la misma fueron 5, 50, 100 y 200 kHz respectivamente.

La aplicación de frecuencias bajas permite la valoración de la cantidad de agua extracelular, mientras que el aumento de las mismas hace que la corriente penetre en las membranas celulares por lo que, con ellas, se obtienen datos del componente de agua intracelular y de la cantidad de agua corporal total.

Existen fórmulas matemáticas, basadas en modelos de regresión ajustados a sexo, peso, talla y edad, que permiten el cálculo del resto de los compartimentos corporales. Se recogieron por su especial interés los porcentajes de masa grasa, y masa muscular, así como la cantidad de masa magra corporal y del agua corporal y sus componentes.

## 2.3.- Datos de laboratorio:

### 2.3.1.- Determinación de valores bioquímicos:

Se realizó el procesamiento habitual de muestras sanguíneas del Servicio de Análisis Clínicos del HCSC de Madrid para la determinación de los datos de hemograma, coagulación, y de los perfiles renal, hepático, metabólico (iones, glucosa y lípidos) y hormonales (tiroides y paratiroides).

La determinación de los **oligoelementos** se realizó mediante absorción atómica.

La **cistatina C** sérica fue medida mediante el kit *N LatexCystatin C*, un método inmunonefelométrico realizado en el sistema BN Prospec® de Siemens Diagnostics (Siemens HealthcareDiagnostics. Marburg. Germany).



Los valores de **vitaminas A y E** se obtuvieron mediante cromatografía. Se utilizaron muestras de suero obtenidas de los sujetos en ayunas. Se empleó el método de ChromsystemsDiagnostics® (Munich, Alemania) en un Shimadzu HPLC®. El rango de análisis para la vitamina A es de 0,02 – 2, 25 mg/l y de 2,25 – 45 mg/l para la vitamina E.

La **RBP** se determinó también en suero mediante inmunonefelometría en un nefelómetro BN Prospec® de Siemens Diagnostics (Siemens HealthcareDiagnostics. Marburg. Germany). La RBP presente en el suero reacciona inmunoquímicamente con anticuerpos específicos formando inmunocomplejos, los cuales pueden dispersar un rayo de luz incidente dentro de una reacción inmunoquímica. La intensidad de la luz dispersada es proporcional a la concentración de RBP en la muestra. La RBP tiene un rango de ensayo entre 1,2 - 20 mg/dL, el rango de referencia en adultos va de 3 – 6 mg/dL.

En la determinación de los valores de **vitamina D**, se utilizó ARCHITECT 25-OH Vitamin D de AbbotDiagnostics®, un inmunoanálisis de micropartículas quimioluminiscentes. Las muestras de suero se combinan con micropartículas paramagnéticas recubiertas de anti-vitamina D. Posteriormente se añaden complejos conjugados de anticuerpos anti-vitamina D biotinizados marcados con acridinium que se unirán a los espacios libres de las micropartículas anti-vitamina D. La reacción lumínica es medida como unidades de luz relativa y existe una relación indirecta entre la cantidad de vitamina D en el suero y las unidades de luz medidas. El rango de detección es de 0 a 160 ng/ml.

La **insulina** se determinó mediante IMMULITE 2000 Insulina (Siemens®): Inmunoanálisis quimioluminiscente inmunométrico en fase sólida marcado con fosfatasa alcalina. La fase sólida consiste en una bola recubierta de anticuerpo monoclonal murino anti-insulina. La fase líquida contiene fosfatasa alcalina de intestino de ternera conjugada con un anticuerpo policlonal antiinsulina de oveja y fosfatasa alcalina conjugada con anticuerpo monoclonal murino antiinsulina. La determinación se realiza en suero y el rango analítico del ensayo es de 2 – 300 µIU/mL.

Para el cálculo del **HOMA** se utilizó la fórmula matemática descrita en el apartado anterior(234):

$$\frac{\text{Glucosa basal (mg/dl)} \times \text{Insulina basal (\mu UI/ml)}}{405}$$

### 2.3.2.- Determinación de LBP e IL6:

Este análisis se realizó en el Departamento de Hormonas y Metabolismo del Servicio de Análisis Clínicos del HCSC de Madrid.

Los valores de **LBP** se obtuvieron mediante inmunoensayos quimioluminiscentes en fase sólida realizados en un Immulite 1000 (Siemens Diagnóstica). Se utilizaron muestras de suero conservadas a -80°C inmediatamente después de la descongelación a temperatura ambiente. Los valores de referencia de LBP presentaban una media de 5,3 µg/ml y un percentil 95 de 8,4 µg/ml.

Para la determinación de **IL6** se utilizó un inmunoensayo electroquimioluminiscente "ECLIA" tipo sandwich realizado en un Cobas E-411 (Roche Diagnostics). También realizado en suero conservado a -80°C inmediatamente después de la descongelación. Los valores de referencia son de 0.1-7 pg/mL.

### 2.3.3.- Determinación de datos microbiológicos:

En el Servicio de Microbiología del HCSC se realizaron las determinaciones virológicas habituales.

La determinación del **ARN del VHC** se obtuvo mediante la utilización del COBAS AmpliPrep/COBAS Taqman HCV Test (Roche®). Es una prueba de amplificación *in vitro* del ARN del VHC, con límite inferior de detección de 15 UI/ml.

Para el estudio del **genotipo viral** se empleó el método de diagnóstico *in Vitro* Versant® HCV Genotype 2.0, ensayo de hibridación inversa.

### 2.3.4.- Determinación de polimorfismos genéticos:

El genotipado de los diversos SNP fue realizado mediante la técnica Taqman (Biociencias Aplicadas, Madrid, España) diseñadas específicamente para la detección de:

- **IL28B**: rs12979860.
- **PNPLA3**: rs738409 (C\_\_\_7241\_10).
- **DBP, gen Gc**: rs7041 (C\_\_\_3133594\_30) y rs4588 (C\_\_\_8278879\_10).

La detección se llevó a cabo por qPCR en un termociclador Realplex (Eppendorf, Madrid, España), usando sondas fluorescentes.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: tras un tiempo de desnaturalización de 10 minutos a 96°C, se realizaron 45 ciclos de 92°C durante 15 segundos y a 60°C durante 90 segundos. La fluorescencia se midió después de cada ciclo y al finalizar el proceso.

Todas las muestras se determinaron por triplicado, y se asignaron los genotipos a través de un software de identificación (RealPlex 2.0, Eppendorf, Madrid, España) y por análisis del número de referencia del ciclo para cada curva de fluorescencia, calculado con el algoritmo CalQplex (Eppendorf, Madrid, España).

Para cada SNP, se secuenciaron los fragmentos amplificados de 20 sujetos heterocigotos y de hasta 20, cuando fue posible, muestras de sujetos homocigotos (mutados y no-mutados). En todos los casos, los genotipos correspondieron con los detectados con sondas fluorescentes. Los haplotipos de los SNPs para el gen Gc de la DBP obtenidos fueron reconstruidos y analizados mediante el programa estadístico PHASE, permitiéndonos así valorar los diferentes fenotipos (284).

**Tabla 5:** Combinaciones fenotípicas de isoformas de la proteína DBP determinadas por la aplicación de software PHASE.

rs7041	rs4588	Fenotipo
GG	CC	Gc1S/Gc1S
GT	CA	Gc1S/Gc2
GT	CC	Gc1S/Gc1F
TT	CA	GcF1/Gc2
TT	AA	GsC2/GsC2
TT	CC	Gc1F/Gc1F

### **3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

Los datos fueron recogidos en una base de datos en la Unidad de Hígado del HCSC. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS®, versión 22.0.

#### **3.1- Descripción de las variables cuantitativas:**

Las variables cuantitativas analizadas han sido las siguientes:

- Edad: expresada en años.
- LBP: expresada en pg/ml.
- IL6: expresada en µg/ml.
- IMC: expresado en kg/m<sup>2</sup>.
- Masa grasa corporal: expresada en porcentaje.
- Masa muscular corporal: expresada en porcentaje.
- Masa magra corporal: expresada en kilos.
- Agua corporal total: expresada en litros.
- Agua intracelular: expresada en litros.
- Agua extracelular: expresada en litros.
- Hemoglobina: expresada en g/dl.
- Leucocitos: expresados por µl.
- Plaquetas: expresadas por µl.
- INR (*International normalized ratio*): adimensional.
- Ferritina: expresada en ng/ml.
- Ácido fólico: expresada en ng/ml.
- Vitamina B<sub>12</sub>: expresada en pg/ml.
- Proteínas: expresada en g/dl.
- Albúmina: expresada en g/dl.
- Glucosa: expresada en mg/dl.

- Insulina: expresada en  $\mu\text{IU/ml}$ .
- HOMA: adimensional.
- Creatinina: expresada en  $\text{mg/dl}$ .
- Aclaramiento creatinina: expresada en  $\text{ml/min}$ .
- Cistatina C: expresada en  $\text{mg/dl}$ .
- AST: expresada en  $\text{UI/l}$ .
- ALT: expresada en  $\text{UI/l}$ .
- GGT: expresada en  $\text{UI/l}$ .
- Cociente AST/ALT: adimensional.
- Fosfatasa alcalina: expresada en  $\text{UI/l}$ .
- Bilirrubina: expresada en  $\text{mg/dl}$ .
- Colesterol y sus fracciones HDL y LDL: expresado en  $\text{mg/dl}$ .
- Triglicéridos: expresada en  $\text{mg/dl}$ .
- Vitamina D: expresada en  $\text{ng/ml}$ .
- Cobre: expresada en  $\mu\text{g/dl}$ .
- Selenio: expresada en  $\mu\text{g/dl}$ .
- Zinc: expresada en  $\mu\text{g/dl}$ .
- Prealbúmina: expresada en  $\text{mg/dl}$ .
- Vitamina A: expresada en  $\text{mg/l}$ .
- Proteína transportadora del retinol: expresada en  $\text{mg/dl}$ .
- Cociente vitamina A/RBP4: expresada en  $\text{mg/mg}$  de RBP.
- Vitamina E: expresada en  $\text{mg/l}$ .

### **3.2- Descripción de las variables cualitativas:**

Las variables cualitativas analizadas han sido las siguientes:

- Sexo: expresada como varón o mujer.
- Genotipo viral: expresado como 1, 2, 3, 4 o indeterminado.
- Carga viral: se consideró la cifra de 400.000 UI/ml el límite entre carga alta y baja (285).
- Distribución del polimorfismo *IL28B*: expresada como CC, CT o TT. Se realizó una agrupación de los datos, resultando dos grupos según los pacientes fueran portadores o no del alelo T.
- Estadío enfermedad: expresada como fibrosis nula o leve (F0-F1), moderada (F2), avanzada (F3) y cirrosis (F4). Dependiendo de la finalidad del análisis estadístico el estadio de fibrosis se categorizó de forma dicotómica en fibrosis nula-leve vs. fibrosis significativa (F0-1 vs. F2-4) o en fibrosis nula-moderada vs. fibrosis avanzada (F0-2 vs. F3-4).
- Presencia de esteatosis según resultados ecográficos o en los casos oportunos de biopsia hepática.
- Resistencia a la insulina: definida por un valor de HOMA > 3.
- Distribución del polimorfismo *PNPLA3* rs\_738409: expresada como CC, CG o GG. Se realizó una agrupación de los datos, resultando dos grupos según los pacientes fueran portadores o no del alelo G.
- Distribución del polimorfismo receptor vitamina D rs\_7041 y rs4588: expresada según las isoformas resultantes descritas anteriormente: Gc1F, Gc1S o Gc2.

### 3.3.- Análisis de datos:

En el análisis descriptivo, las variables categóricas se presentan con su distribución de frecuencias y las cuantitativas con medidas de posición central (media o mediana) y de dispersión, desviación estándar (DE) y rango intercuartílico (RIQ). En todos los casos se comprobó la distribución de la variable frente a los modelos teóricos, utilizando la media con la DE cuando la distribución fue normal y en caso de no normalidad, la mediana y el RIQ.

Se compararon las variables cualitativas mediante el test de  $\chi^2$  o prueba exacta de Fisher, en el caso de que más de un 25% de los valores esperados fueran menores de 5. Al comparar variables cuantitativas de distribución normal con variables cualitativas de dos categorías se utilizó la prueba de t de Student o el equivalente no paramétrico U Mann-Withney en caso de distribuciones no normales. En las comparaciones con variables cualitativas de más de dos categorías se utilizó el test de análisis de la varianza (ANOVA) o el equivalente no paramétrico (Kruskal-Wallis). En todos los casos se comprobó la distribución variable frente a modelos teóricos y se contrastó la hipótesis de homogeneidad de varianzas.

Para las variables finalmente seleccionadas como globalmente más representativas se realizó un análisis multivariado, basado en un modelo de regresión logística mediante el método “Atrás RV” (método automático por pasos, hacia atrás, que utiliza la prueba de la Razón de Verosimilitud para comprobar las covariables a incluir o excluir). Se incluyeron las variables estadísticamente significativas en el análisis univariado. Se identificaron las variables independientemente relacionadas con las variables seleccionadas y se construyó un modelo predictivo con los datos obtenidos. Se realizó una curva ROC para definir los mejores puntos de corte de variables para calcular los valores de sensibilidad y especificidad.

## **V.- RESULTADOS**





## V.- RESULTADOS

### 1.- ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA:

#### 1.1.- Características clínico-epidemiológicas de la población estudiada:

##### 1.1.1.-Aspectos socio-demográficos:

El 51,9% de los pacientes eran mujeres. La edad media fue de 56 años (52 años para los varones y 60 años para las mujeres), con un rango de edad comprendido entre los 37 y los 81 años

##### 1.1.2- Aspectos epidemiológicos en relación con la infección de VHC:

Las principales características epidemiológicas de la población se describen en la Tabla 6.

El genotipo más prevalente fue el 1b, con un 69,6% de los pacientes. Por orden de frecuencia, le seguían el 1a (13,9%), el 3 y el 4, con el mismo porcentaje de casos (7,6%) y en último lugar el genotipo 2 (1,3%).

La mayoría de los pacientes (81%) tenían una carga viral basal mayor de 400.000 UI/ml. En un paciente no se encontraron datos sobre su carga viral registradas en la historia clínica.

El 45,6% de los pacientes se encontraba en un estadio precoz de la enfermedad (F0-F1). El 24,1% estaban en estadio cirrótico (F4). De los valores intermedios de fibrosis, el 17,7% tenía una fibrosis en estadio F3 y el 12,7% en estadio F2. Estadios de fibrosis más avanzada eran más frecuentes en los varones que en las mujeres ( $p=0,016$ ). No se apreciaron diferencias respecto a la edad.

Cerca de la mitad de los enfermos no habían recibido ningún tipo de terapia antiviral (48,1%). El resto de los pacientes habían sido tratados con interferón pegilado y ribavirina, presentando el 29,1% fracaso terapéutico, el 11,4% intolerancia al tratamiento y el 11,4% recidiva.

**Tabla 6:** Datos epidemiológicos de la infección por VHC de los pacientes estudiados.

<b>Genotipo VHC</b>	<b>% (n)</b>
<b>1 a</b>	13,9 (11)
<b>1b</b>	69,6 (55)
<b>2</b>	1,3 (1)
<b>3</b>	7,6 (6)
<b>4</b>	7,6 (6)
<b>Carga viral (UI/ml)</b>	<b>% (n)</b>
<b>&lt; 400.000</b>	17,7 (14)
<b>≥ 400.000</b>	81 (64)
<b>Desconocido</b>	1,3 (1)
<b>Estadio</b>	<b>% (n)</b>
<b>F0-F1</b>	45,6 (36)
<b>F2</b>	17,7 (14)
<b>F3</b>	12,7 (10)
<b>F4</b>	24,1 (19)
<b>Tratamiento previo</b>	<b>% (n)</b>
<b>No terapia</b>	48,1 (38)
<b>Fracaso terapéutico</b>	29,1 (23)
<b>Recidiva</b>	11,4 (9)
<b>Intolerancia</b>	11,4 (9)

### 1.2.- Características analíticas de la población estudiada:

Los principales valores analíticos determinados en la muestra se resumen en la tabla 7.

Se obtuvieron valores de centralización fuera del intervalo definido como normal en 7 variables. Los datos de HOMA, AST, ALT y GGT presentaron valores por encima del intervalo de normalidad, mientras que los datos de vitamina D, prealbúmina y RBP4 se encontraban por debajo.

Tabla 7: Resultados analíticos basales de la población estudiada.

Parámetro	Mediana	RIQ	Valores normales
Hemoglobina* (g/dl)	14,99	1,37	12-16
Plaquetas (/μl)	183000	138000 – 224000	150000-450000
INR	0,9	0,9 – 1	0,8-1,2
Ferritina (ng/dl)	159,4	83,3 – 281	30-350
Ácido Fólico (ng/ml)	8,07	6,24 – 11,75	3,1-20
Vitamina B12 (pg/ml)	407	285,75 – 514,5	180-914
Proteínas (g/dl)	7,3	7 – 7,6	6,5-8,5
Albúmina (g/dl)	4,3	4 – 4,5	3,5-5
Glucosa (mg/dl)	97	90 – 105	60-100
Insulina (μIU/ml)	13,2	10,1 – 20,2	2-29,1
HOMA	<b>3,3</b>	<b>2,2 – 5,3</b>	<b>1-3</b>
Creatinina* (mg/dl)	0,9	0,14	0,5-1,2
Cistatina C* (mg/dl)	0,92	0,15	0,1-1,1
AST (UI/l)	<b>51</b>	<b>38 – 80</b>	<b>5-40</b>
ALT (UI/l)	<b>63</b>	<b>45 – 95</b>	<b>5-30</b>
GGT (UI/l)	<b>55</b>	<b>33-107</b>	<b>1-40</b>
Fosfatasa alcalina (UI/l)	80	64-105	30-120
Bilirrubina total (mg/dl)	0,8	0,6 – 1,1	0,2-1,2
Colesterol* (mg/dl)	176	30,67	140-200
HDL (mg/dl)	55	44 - 67	40-100
LDL (mg/dl)	97,4	78,6- 121,4	1-100
Triglicéridos (mg/dl)	86	72 -136	30-150
Vitamina D (ng/dl)	<b>21,8</b>	<b>15,6 – 30,9</b>	<b>30-100</b>
Ceruloplasmina (mg/dl)	28,7	25,7-31,9	25-63
Cu* (μg/dl)	116,6	20,29	70-140
Se* (μg/dl)	83,29	13,92	50-140
Zn* (μg/dl)	79,40	11,68	60-150
Prealbúmina* (mg/dl)	<b>19,71</b>	<b>6,1</b>	<b>22-42</b>

\* Variables con distribución normal: valores expresados en Media y Desviación estándar.

**Tabla 7 continuación:** Resultados analíticos basales de la población estudiada.

Parámetro	Mediana	RIQ	Valores normales
Vitamina A* (mg/l)	0,35	0,12	0,3-0,8
RBP4 mg/dl	2	1 – 2	3-6
Cociente A/RBP4 (mg/mg)	0,74	0,67 – 0,81	0,8-1,2
LBP	7,27	5,67-8,9	2,2-8,4
IL6	3,54	2,65 -5,71	0,1-7

\* Variables con distribución normal: valores expresados en Media y Desviación estándar.

### 1.3.- Características antropométricas de la población estudiada:

Se obtuvieron los datos de la composición corporal de 74 pacientes. En otros cuatro el estudio de bioimpedancia no fue válido por ser portadores de prótesis metálicas. Otros dos pacientes no se sometieron a este estudio. Los valores antropométricos obtenidos mediante BIA corporal se resumen en la tabla 8.

**Tabla 8:** Características antropométricas de la población estudiada.

	Global		Varones		Mujeres		p
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
IMC *	26,4	4,52	26,22	2,86	26,9	5,73	0,495
Grasa (%)	29,3	23,6-39,8	24,1	19,7-26,8	39,55	31,3-45	<0,001
Músculo (%)	70,7	60,1-76,3	75,9	73,2-80,3	60,45	54,9-68,7	<0,001
M. magra (kg)	10,4	7,6-14,9	14,9	12,2-17,2	7,65	6,2-8,9	<0,001
Agua tot (l)	53,95	48,6 -57,3	55,6	53,3-59,3	51,2	44,6-54,4	<0,001
Agua IC (l)	28,9	24,5-32	32,1	30,7-33,9	25,4	23,6-27,7	<0,001
Agua EC (l)	23,6	22,1-26,1	23,3	22,6-25,5	24	21,5-26,7	0,938

RIQ: rango intercuartílico. M:masa. Tot: total. IC: intracelular. EC: extracelular. p: Significación estadística.

\* Variables con distribución normal: valores expresados en Media y Desviación estándar. Valor de p obtenido mediante t de Student.

Se objetivaron diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres. Los varones poseían un mayor porcentaje de masa muscular y de agua corporal

total, con una mayor cantidad consecuentemente de agua extracelular y masa magra. Las mujeres tenían un mayor componente graso corporal.

Respecto a la edad, se observaron correlaciones significativas con diferentes componentes corporales. A más edad, mayor porcentaje graso y menor porcentaje de masa muscular y masa magra, menor cantidad de agua corporal total y de agua intracelular. (Tabla 9)

**Tabla 9:** Coeficientes de correlación entre parámetros antropométricos y la edad de la población estudiada.

	EDAD	
	Rho Spearman	p
Grasa	0,66	<0,001
Músculo	-0,66	<0,001
Masa magra	-0,615	<0,001
Agua total	-0,455	<0,001
Agua intracelular	-0,299	0,012

p: Significación estadística.

#### 1.4.- Distribución de los polimorfismos genéticos estudiados:

Se analizaron los diferentes polimorfismos genéticos de un total de 76 pacientes.

##### 1.4.1.- Polimorfismo IL28B:

El 22% de los pacientes presentaban un genotipo de la IL28B CC, el resto eran portadores del alelo T en homo o heterocigosis. (Tabla 10).

**Tabla 10:** Distribución de los genotipos IL28B en la población estudiada.

Polimorfismo IL28B	% (n)
CC	22,4 (17)
CT	56,6 (43)
TT	21,1 (16)

#### 1.4.2.- Polimorfismos genéticos de la DBP:

Los resultados de los dos polimorfismos estudiados se expresan en forma de las isoformas proteicas obtenidos del procesamiento mediante el programa PHASE. De esta forma, el 30,3% de los sujetos poseían una isoforma Gc1S, el 27,6% eran portadores de Gc1F y la proporción de pacientes mayor era la correspondiente a Gc2. (Tabla 11)

**Tabla 11:** Distribución de las isoformas de DBP y de las combinaciones fenotípicas establecidas mediante el programa PHASE

Isoformas DBP	% (n)
<b>Gc1F (rs7041T/rs4588C)</b>	22 (14,4)
<b>Gc1S (rs7041G/rs4588C)</b>	90 (59,3)
<b>Gc2 (rs7041T/rs4588A)</b>	40 (26,3)
Fenotipos DBP	% (n)
<b>Gc1S/Gc1S</b>	23 (30,3)
<b>Gc1S/Gc2</b>	30 (39,5)
<b>Gc1S/Gc1F</b>	14 (18,4)
<b>GcF1/Gc2</b>	6 (7,9)
<b>Gc2/Gc2</b>	2 (2,6)
<b>Gc1F/Gc1F</b>	1 (1,3)

#### 1.4.3.- Genotipos PNPLA3:

De la población estudiada, un total de 47,4% de los pacientes eran portadores del alelo mutado G, el 36,8% del total en heterocigosis y un 10,5 % en homocigosis. (Tabla 12)

**Tabla 12:** Distribución de los genotipos *PNPLA3* en la población estudiada

Genotipo PNPLA3	% (n)
CC	52,6 (40)
GC	36,8 (28)
GG	10,5 (8)



## 2.- ANÁLISIS DE LOS ASPECTOS NUTRICIONALES DE LA HCC:

### 2.1.- Composición corporal y parámetros bioquímicos nutricionales

En la siguiente tabla (Tabla 13) se resumen las variables bioquímicas que resultaron estadísticamente relacionadas con los parámetros antropométricos.

**Tabla 13:** Coeficientes de correlación entre parámetros bioquímicos seleccionados y parámetros antropométricos. Expresados como coeficiente correlación de Spearman (rho)/ coeficiente de significación estadística (p).

	IMC	Grasa	Músculo	Magra
<b>Creatinina</b>	-0,12/0,920	<b>-0,59/&lt;0,001</b>	<b>0,59/&lt;0,001</b>	<b>0,56/&lt;0,001</b>
<b>Ácido Úrico</b>	<b>0,35/0,001</b>	-0,17/0,136	0,17/0,136	<b>0,4/&lt;0,001</b>
<b>HDL</b>	<b>-0,29/0,011</b>	<b>0,29/0,010</b>	<b>-0,29/0,010</b>	<b>0,52/&lt;0,001</b>
<b>Vitamina D</b>	0,07/0,534	-0,16/0,169	0,16/0,169	<b>0,27/0,018</b>
<b>Cobre</b>	0,22/0,079	<b>0,5/&lt;0,001</b>	<b>-0,5/&lt;0,001</b>	<b>-0,35/0,004</b>
<b>Prealbúmina</b>	-0,09/0,431	<b>-0,39/0,001</b>	<b>0,39/0,001</b>	<b>0,37/0,001</b>
<b>Vitamina A</b>	-0,2/0,076	<b>-0,25/0,028</b>	<b>0,25/0,028</b>	0,17/0,129

	Agua total	Agua intracelular	Agua extracelular
<b>Creatinina</b>	<b>0,51/&lt;0,001</b>	<b>0,58/&lt;0,001</b>	0,17/0,142
<b>Ácido Úrico</b>	-0,02/0,832	<b>0,35/&lt;0,001</b>	<b>-0,38/0,001</b>
<b>HDL</b>	-0,15/0,189	<b>-0,41/&lt;0,001</b>	0,11/0,329
<b>Vitamina D</b>	0,13/0,260	<b>0,29/0,010</b>	-0,07/0,557
<b>Cobre</b>	<b>-0,49/&lt;0,001</b>	<b>-0,38/0,002</b>	<b>-0,3/0,017</b>
<b>Prealbúmina</b>	<b>0,32/0,006</b>	<b>0,39/0,001</b>	-0,01/0,874
<b>Vitamina A</b>	<b>0,3/0,009</b>	0,19/0,101	0,13/0,270

p: Significación estadística.

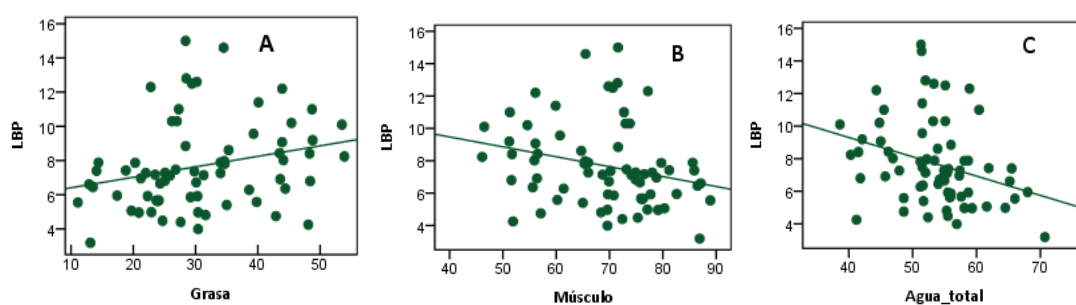
#### 2.1.1.- Composición corporal e inflamación

Se realizaron análisis de correlación entre los diferentes valores antropométricos corporales y los niveles de IL6 y LBP séricos. Se observó que existía una relación estadísticamente significativa entre LBP y el porcentaje de grasa, masa muscular y el agua total. En el caso de la IL6, el IMC, el agua corporal total y el agua extracelular eran los parámetros relacionados (Tabla 14). Se representan mediante gráficos de dispersión las variables estadísticamente significativas (Figuras 10 y 11).

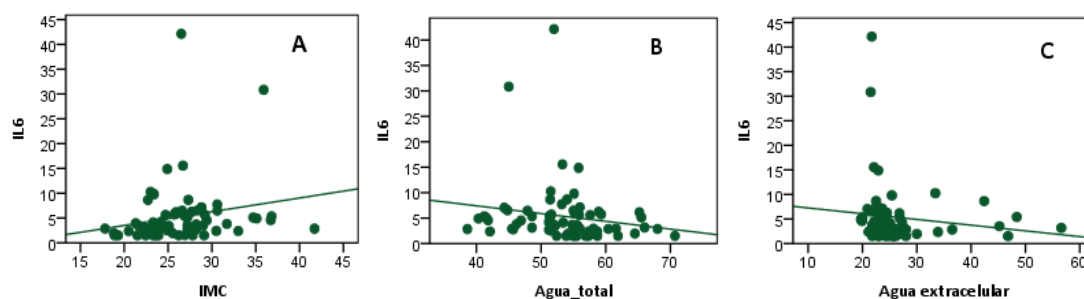
**Tabla 14:** Coeficientes de correlación entre parámetros de composición corporal, LBP e IL6.

	LBP		IL6	
	rho (Spearman)	P	rho (Spearman)	p
IMC	0,22	0,058	<b>0,348</b>	<b>0,003</b>
Grasa	<b>0,29</b>	<b>0,014</b>	0,130	0,286
Músculo	<b>-0,29</b>	<b>0,014</b>	-0,130	0,286
Magra	-0,7	0,568	0,174	0,153
Agua total	<b>-0,365</b>	<b>0,002</b>	<b>-0,27</b>	<b>0,025</b>
Agua intracelular	0,158	0,198	-0,12	0,921
Agua extracelular	-0,154	0,211	<b>-0,27</b>	<b>0,022</b>

p: Significación estadística.



**Figura 10:** Dispersión de LBP y % grasa (A), % muscular (B) y agua corporal total (C).



**Figura 11:** Dispersión de IL6 e IMC (A), agua corporal total (B) y agua extracelular (C).

### 2.2.2.- Composición corporal y estadio de la enfermedad

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de composición corporal y los diferentes estadios de la enfermedad. Únicamente se apreció una diferencia reseñable en el IMC ( $p=0,043$ ) entre los grupos de fibrosis leve-moderada (F0-F2) y avanzada (F3-F4). (Apéndice 3: Tabla A1)

### 2.2.3.- Composición corporal y genotipos IL28B

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas reseñables en los valores de parámetros antropométricos entre los diferentes genotipos de la IL28B. En el caso del IMC y del agua extracelular sí que se apreciaba una diferencia con una  $p=0,042$  en ambas. (Apéndice 3: Tabla A2).

### 2.2.4.- Composición corporal, presencia de esteatosis y genotipos PNPLA3

No existían diferencias significativas en los valores de parámetros antropométricos en pacientes con y sin EH. (Apéndice 3, Tabla A3).

Para los genotipos de *PNPLA3*, tampoco existieron diferencias entre los portadores del alelo mutado G, bien en homo o heterocigosis, y los portadores CC en relación a los parámetros antropométricos (Apéndice 3, Tabla A4).

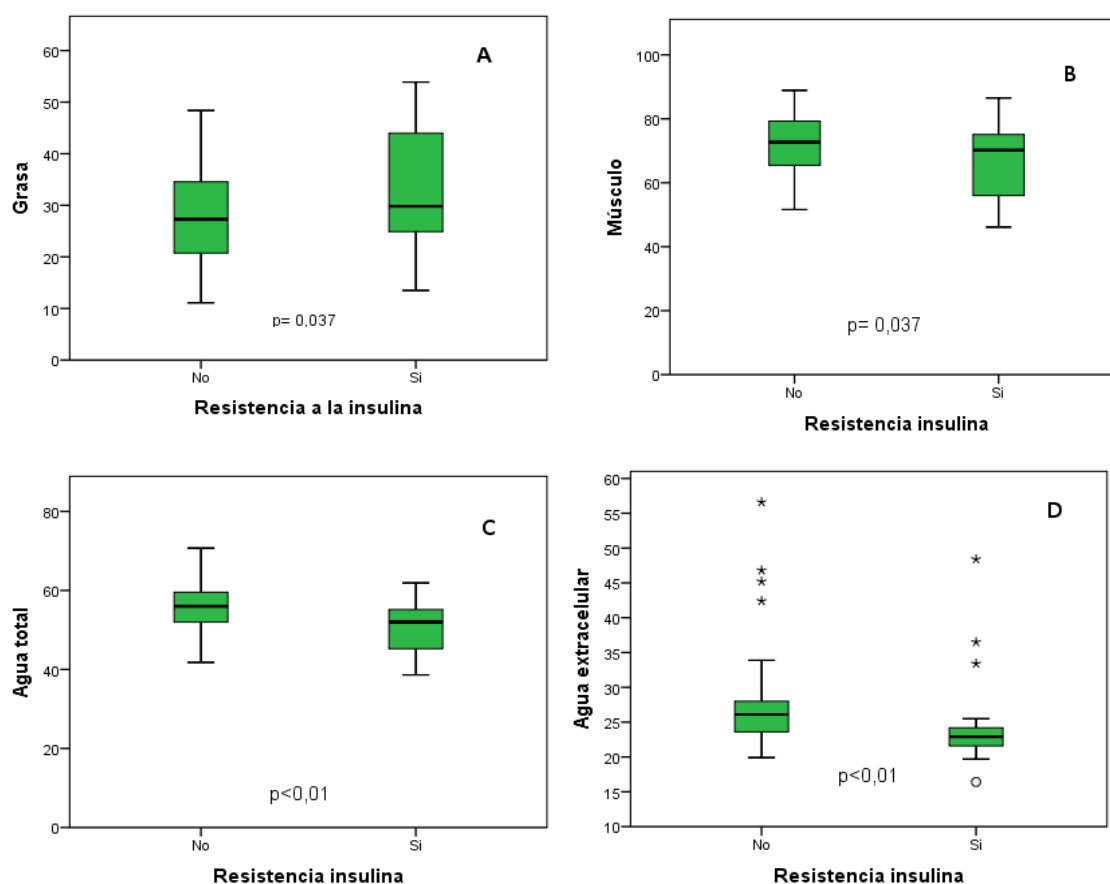
### 2.2.5.- Composición corporal y resistencia a la insulina

Existían diferencias significativas entre los pacientes con y sin RI, definida como  $HOMA > 3$ , en los parámetros de componente graso, muscular, agua corporal total y agua extracelular. (Tabla 15, Figura 12)

**Tabla 15:** Composición corporal en pacientes con y sin RI.

	<u>SIN RI</u>		<u>CON RI</u>		<b>P</b>
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>IMC</b>	23,5	20,95-34,6	27,3	24,7-44,1	<b>&lt;0,001</b>
<b>Grasa</b>	28,25	65,3-79	29,8	55,9-75,3	<b>0,037</b>
<b>Músculo</b>	71,75	7,07-13,8	70,2	7,9-16,2	<b>0,037</b>
<b>Magra</b>	8,5	25,1-32,5	11,5	24,5-31,9	0,288
<b>Agua total</b>	55,75	51,6-60,6	52	45-55,2	<b>0,001</b>
<b>Agua IC</b>	28,6	25,1-32,5	29,1	24,5-31,9	0,937
<b>Agua EC</b>	26,1	23,5-284,47	22,9	21,5-24,4	<b>&lt;0,001</b>

RIQ: rango intercuartílico. Agua IC: agua intracelular. Agua EC: agua extracelular. p: Significación estadística.



**Figura 12:** Representación gráfica de las diferencias significativas en el componente graso (A), muscular (B), agua corporal total (C) y agua extracelular (D), entre los pacientes con y sin resistencia a la insulina.

Los coeficientes de correlación entre el HOMA y los resultados de BIA no fueron estadísticamente significativos en el caso del componente graso y el muscular, pero sí en el del agua corporal total y extracelular. (Tabla 16)

**Tabla 16:** Coeficientes de correlación entre parámetros de composición corporal y HOMA.

	HOMA	
	rho (Spearman)	P
<b>Grasa</b>	0,203	0,083
<b>Músculo</b>	-0,203	0,083
<b>Agua total</b>	-0,352	<0,001
<b>Agua extracelular</b>	-0,423	<0,001

p: Significación estadística.

## 2.2.- Análisis de parámetros bioquímicos nutricionales:

Se seleccionaron como parámetros bioquímicos nutricionales el colesterol, la albúmina y la prealbúmina, datos disponibles en todos los pacientes.

No existían relaciones significativas de estos valores con la edad. Se objetivó que los valores de prealbúmina era menores en mujeres que en varones de forma estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ).

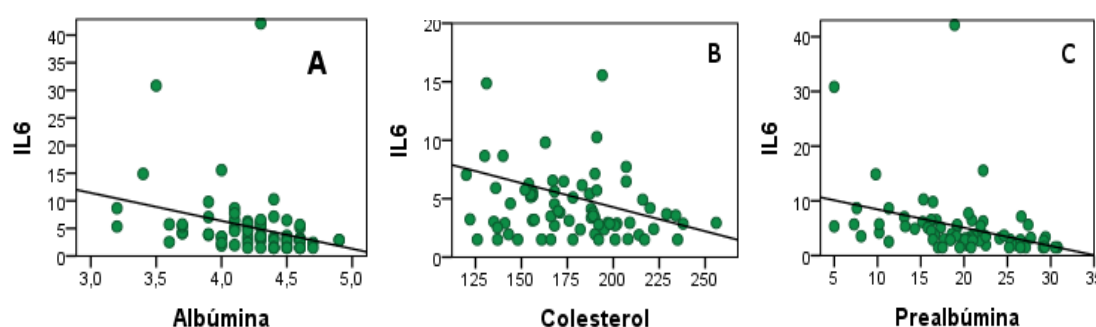
### 2.2.1.- Parámetros bioquímicos nutricionales e inflamación

La IL6 presentaba una correlación significativa negativa con los tres parámetros. En el caso de LBP, no existía significación estadística. (Tabla 17, Figura 13)

**Tabla 17:** Coeficientes de correlación entre parámetros bioquímicos nutricionales, IL6 e LBP.

	LBP		IL6	
	rho (Spearman)	P	rho (Spearman)	p
<b>Albúmina</b>	-0,39	0,745	-0,49	<b>&lt;0,001</b>
<b>Colesterol</b>	0,9	0,445	-0,24	<b>0,037</b>
<b>Prealbúmina</b>	-0,65	0,593	-0,51	<b>&lt;0,001</b>

p: Significación estadística.



**Figura 13:** Dispersión de IL6 y albúmina (A), colesterol (B) y prealbúmina (C).

### 2.2.2.- Parámetros bioquímicos nutricionales y estadio de la enfermedad

Existían diferencias estadísticamente significativas en los valores de albúmina y colesterol entre los pacientes con fibrosis leve-moderada y avanzada. (Tabla 18)

**Tabla 18:** Parámetros bioquímicos nutricionales en los diferentes estadios evolutivos.

	<u>F0-F2</u>		<u>F3-F4</u>		P
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>Albúmina</b>	4,4	4,2-4,6	4,2	3,9-4,4	<b>&lt;0,001</b>
<b>Colesterol</b>	188	166-209	167	150-191	<b>0,027</b>
<b>Prealbúmina</b>	20,4	17,5-26	19,1	14,2-22,2	0,076

RIQ: rango intercuartílico. p: Significación estadística.

### 2.2.3.- Parámetros bioquímicos nutricionales y genotipos *IL28B*

No se apreciaron diferencias significativas en los valores de los parámetros bioquímicos nutricionales entre los diferentes genotipos de *IL28B*. (Apéndice 3, Tabla A5).

Se realizó un subestudio sobre los valores de parámetros del metabolismo lipídico en los portadores del alelo T y se detectaron diferencias significativas en los valores de HDL. (Tabla 19)

**Tabla 19:** Parámetros bioquímicos de metabolismo lipídico en los pacientes portadores del alelo T de *IL28B*.

	<u>CC</u>		<u>Portador alelo T</u>		P
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>HDL</b>	46	37,5-53,5	58	46-68	<b>0,002</b>
<b>LDL</b>	104	89-140	94	77,4-121,4	0,140
<b>Triglicéridos</b>	83,5	71-137,5	92	72-137	0,852

RIQ: rango intercuartílico. p: Significación estadística.

#### 2.2.4.- Parámetros bioquímicos nutricionales, esteatosis hepática y genotipo *PNPLA3*

No existían diferencias en los parámetros bioquímicos nutricionales entre los pacientes con y sin EH, ni entre los diferentes genotipos de *PNPLA3*. (Apéndice 3, Tabla A6 y A7).

#### 2.2.5.-Parámetros bioquímicos nutricionales y resistencia a la insulina

Tampoco se detectaron diferencias en los valores de albúmina, colesterol y prealbúmina en los pacientes con y sin RI. (Apéndice 3, Tabla A8).

### **2.3.- Análisis de oligoelementos:**

Se pudo realizar la determinación de oligoelementos en 78 pacientes en el caso del Se, en 66 para el Cu y 67 para el Zn.

Se detectaron valores de cobre significativamente mayores en mujeres que en varones ( $p=0,001$ ), así como una correlación del cobre sérico con la edad del individuo ( $r=0,385$ ;  $p=0,002$ ).

Existe una correlación positiva significativa entre las concentraciones de Se y Zn ( $r= 0,478$ ;  $p<0,001$ ).

#### 2.3.1.- Oligoelementos y otros parámetros bioquímicos

Se realizó un análisis univariado entre los valores de Cu, Se y el Zn con el resto de parámetros bioquímicos, nutricionales y no nutricionales, incluidos en el estudio. Los resultados significativos se resumen en la siguiente tabla. (Tabla 20)

**Tabla 20:** Coeficientes de correlación de los oligoelementos con datos bioquímicos.

	<u>Se</u>		<u>Cu</u>		<u>Zn</u>	
	Rho	P	Rho	P	Rho	p
Hemoglobina	0,047	0,681	-0,188	0,131	0,311	<b>0,010</b>
Plaquetas	0,282	<b>0,013</b>	0,241	0,051	0,212	0,084
INR	-0,126	0,271	-0,215	0,083	-0,347	<b>0,004</b>
Fibrinógeno	0,182	0,111	0,414	<b>0,001</b>	0,297	<b>0,015</b>
Albúmina	0,552	<b>&lt;0,001</b>	0,130	0,299	0,69	<b>&lt;0,001</b>
Glucosa	0,080	0,488	0,293	<b>0,017</b>	-0,020	0,873
HOMA	-0,19	0,096	-0,018	0,886	-0,267	<b>0,029</b>
Urea	0,334	<b>0,003</b>	-0,095	0,449	0,168	0,175
Creatinina	0,090	0,436	-0,261	<b>0,034</b>	0,215	0,081
Cistatina	-0,263	<b>0,023</b>	-0,028	0,824	-0,139	0,270
LDH	-0,093	0,420	0,119	0,343	-0,402	<b>0,001</b>
AST	-0,234	<b>0,039</b>	-0,090	0,474	-0,457	<b>&lt;0,001</b>
AST/ALT	-0,506	<b>&lt;0,001</b>	0,173	0,165	-0,4	<b>0,001</b>
GGT	-0,295	<b>0,009</b>	-0,292	<b>0,017</b>	-0,28	<b>0,022</b>
Fosfatasa alcalina	-0,302	<b>0,007</b>	0,271	<b>0,028</b>	-0,527	<b>&lt;0,001</b>
Colesterol	0,082	0,477	0,271	<b>0,028</b>	0,333	<b>0,006</b>
LDL-colesterol	0,131	0,252	0,221	0,075	0,445	<b>&lt;0,001</b>
Triglicéridos	-0,293	<b>0,009</b>	0,111	0,374	-0,058	0,639
Calcio	0,356	<b>0,002</b>	0,132	0,290	0,306	<b>0,012</b>
Prealbúmina	0,352	<b>0,002</b>	-0,083	0,518	0,545	<b>&lt;0,001</b>
Ceruloplasmina	0,012	0,924	0,895	<b>&lt;0,001</b>	0,153	0,250

Rho: Coeficiente de correlación de Spearman. p: Significación estadística.



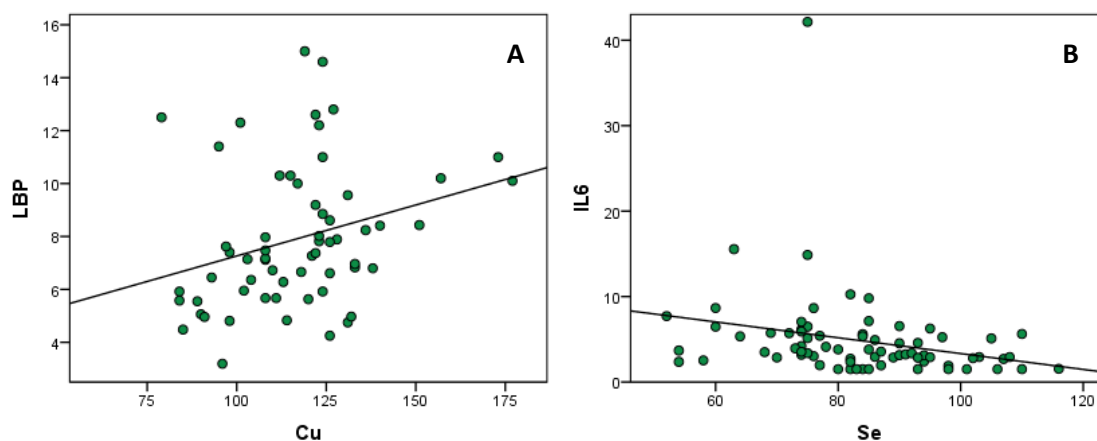
### 2.3.2.-Oligoelementos e inflamación

Se detectaron correlaciones estadísticamente significativas entre Se e IL6 y Cu y LBP. (Tabla 21. Figura 14)

**Tabla 21:** Coeficientes de correlación entre oligoelementos, IL6 y LBP.

	LBP		IL6	
	rho (Spearman)	P	rho (Spearman)	p
<b>Selenio</b>	-0,156	0,188	-0,409	<b>&lt;0,001</b>
<b>Cobre</b>	0,328	<b>0,010</b>	0,076	0,562
<b>Zinc</b>	-0,118	0,362	-0,496	<b>&lt;0,001</b>

Rho: Coeficiente de correlación de Spearman. p: Significación estadística.



**Figura 14:** Gráficos de dispersión de LBP y Cu (A), IL6 y Se (B).

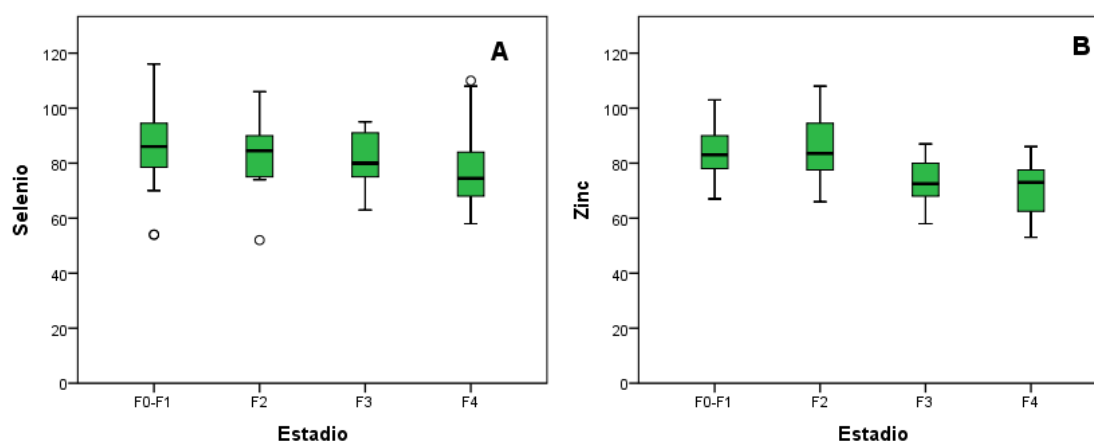
### 2.3.3.- Oligoelementos y estadio de la enfermedad

Se apreciaron diferencias significativas en los valores de Se y Zn en los diferentes estadios evolutivos de la HCC. Concentraciones menores de Se y Zn se detectaron en los estadios más avanzados. (Tabla 22, Figura 15).

**Tabla 22:** Oligoelementos en los diferentes estadios evolutivos.

	<u>F0-F2</u>		<u>F3-F4</u>		<b>P</b>
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>Se</b>	88	76,25-94,75	77	74-89,5	<b>0,031</b>
<b>Cu</b>	122	108-131,7	115	97,5-123,5	0,090
<b>Zn</b>	83	77,25-89,75	76	68-83	<b>0,003</b>

RIQ: rango intercuartílico. p: Significación estadística.



**Figura 15:** Concentraciones de Se (A) y Zn (B) para los distintos estadios evolutivos de la HCC.

#### 2.3.4.-Oligoelementos y genotipo *IL28B*

Únicamente se detectaron valores significativamente menores para la cuantificación de zinc en pacientes portadores del alelo T. (Tabla 23)

**Tabla 23:** Oligoelementos en los pacientes portadores del alelo T de *IL28B*.

	<u>CC</u>		<u>Portador alelo T</u>		<b>P</b>
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>Se</b>	86	75-95	82	74-92	0,410
<b>Cu</b>	115	108-126	122	102-126	0,834
<b>Zn</b>	84	76-97	79	72-84	<b>0,047</b>

RIQ: rango intercuartílico. p: Significación estadística.

### 2.3.5.-Oligoelementos, esteatosis hepática y genotipo PNPLA3

No existían diferencias significativas en los valores de oligoelementos ni en los diferentes genotipos *PNPLA3* entre los pacientes con y sin EH. (Apéndice 3, Tablas A9 y A10).

### 2.3.6.-Oligoelementos y resistencia a la insulina

El Se y el Cu no mostraron diferencias en los pacientes con y sin RI. El Zn presentaba diferencias estadísticamente significativas, con valores inferiores de Zn en pacientes con RI. (Tabla 24)

**Tabla 24:** Oligoelementos en los pacientes con y sin RI.

	<u>No RI</u>		<u>RI</u>		P
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>Se</b>	85	74,75-94,75	82	74-90	0,436
<b>Cu</b>	118	98-126	117	103-127	0,943
<b>Zn</b>	83	73,5-89,75	77,5	69-83	<b>0,041</b>

RIQ: rango intercuartílico. p: Significación estadística.

### 2.4.- **Análisis de vitamina A, RBP4 y cociente vitamina A/RBP4:**

Se obtuvieron los valores séricos de vitamina A y RBP4 en 79 pacientes. Su cociente se pudo calcular únicamente en 77 pacientes, ya que dos de los sujetos presentaban valores de RBP4 muy bajos por lo que el cociente no era valorable. En estos casos, se ha considerado que su valor era inferior al considerado como normal.

Un 26,6% de los pacientes (n=21) presentaba un valor de vitamina A por debajo del límite inferior de la normalidad. Respecto a RBP4, un 34,2% de los pacientes presentaba deficiencia de esta proteína (n=27). El cociente vitamina A/RBP4 era menor al límite considerado normal en un 67,1% de los casos incluidos.

Las mujeres presentaban valores más bajos de vitamina A y RBP4 que los hombres (p=0,044 y p=0,006 respectivamente). No existían diferencias respecto a la edad.

### 2.4.1.-Vitamina A, RBP4, cociente A/RBP4 y otros parámetros bioquímicos.

A continuación se detallan los resultados significativos del estudio de correlación univariado realizado mediante la correlación de Spearman (Tabla 25).

**Tabla 25:** Coeficientes de correlación de la vitamina A, RBP4 y su cociente con diferentes parámetros bioquímicos.

	Vitamina A		RBP4		Cociente A/RBP4	
	Rho	P	Rho	P	Rho	p
Plaquetas	0,338	<b>0,002</b>	0,428	<b>&lt;0,001</b>	0,004	0,971
INR	-0,337	<b>0,001</b>	-0,392	<b>&lt;0,001</b>	-0,055	0,634
Fibrinógeno	0,116	0,308	-0,286	<b>0,011</b>	-0,253	<b>0,027</b>
Vitamina B <sub>12</sub>	-0,220	0,056	-0,295	<b>0,010</b>	0,160	0,175
Albúmina	0,440	<b>&lt;0,001</b>	0,463	<b>&lt;0,001</b>	0,033	0,778
Glucosa	0,135	0,237	0,335	<b>0,003</b>	-0,177	0,123
HOMA	-0,264	<b>0,019</b>	-0,076	0,505	-0,360	<b>0,001</b>
Insulina	-0,269	<b>0,016</b>	-0,098	0,392	-0,359	<b>0,001</b>
Creatinina	0,457	<b>&lt;0,001</b>	0,286	<b>0,011</b>	0,031	0,790
LDH	-0,416	<b>&lt;0,001</b>	-0,456	<b>&lt;0,001</b>	0,009	0,941
AST	-0,519	<b>&lt;0,001</b>	-0,524	<b>&lt;0,001</b>	-0,111	0,335
ALT	-0,388	<b>&lt;0,001</b>	-0,448	<b>&lt;0,001</b>	-0,025	0,827
AST/ALT	-0,263	<b>0,019</b>	-0,147	0,196	-0,124	0,284
GGT	0,096	0,400	0,066	0,566	-0,243	<b>0,033</b>
Fosfatasa alcalina	-0,349	<b>0,002</b>	-0,235	<b>0,037</b>	-0,245	<b>0,032</b>
Bilirrubina total	-0,182	0,108	0,286	<b>0,011</b>	0,048	0,677
Calcio	0,261	<b>0,020</b>	0,224	<b>0,047</b>	0,061	0,599
Fósforo	-0,062	0,584	-0,005	0,967	0,271	<b>0,017</b>
Vitamina D	0,267	<b>0,017</b>	0,143	0,207	0,237	<b>0,038</b>
Se	0,331	<b>0,003</b>	0,236	<b>0,038</b>	0,202	0,080
Zn	0,435	<b>&lt;0,001</b>	0,460	<b>&lt;0,001</b>	0,162	0,197
Prealbúmina	0,748	<b>&lt;0,001</b>	0,704	<b>&lt;0,001</b>	-0,139	0,239
Vitamina E	0,189	0,095	0,203	0,073	0,327	<b>0,004</b>

rho: Coeficiente de correlación de Spearman. p: Significación estadística.

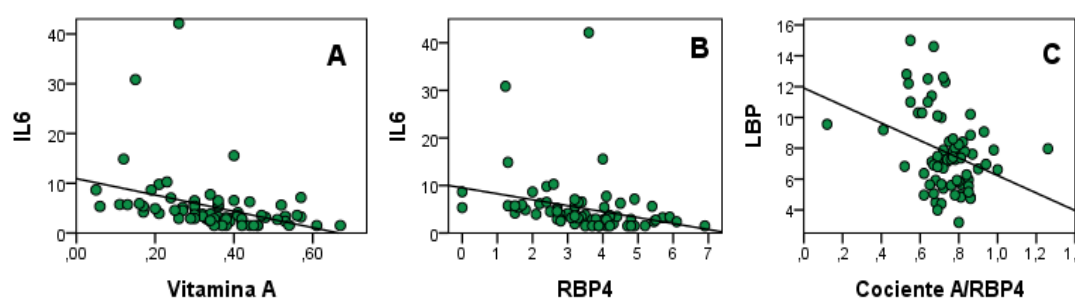
### 2.4.2.-Vitamina A, RBP4, cociente A/RBP4 e inflamación

Los valores de IL6 presentaban una correlación significativa negativa con los niveles séricos de vitamina A y RBP4. Para LBP, solo se apreció una relación significativa con el cociente entre la vitamina A y la RBP4. (Tabla 26. Figura 16)

**Tabla 26:** Coeficientes de correlación entre vitamina A, RBP4, cociente A/RBP4, IL6 y LBP.

	LBP		IL6	
	rho (Spearman)	P	rho (Spearman)	P
<b>Vitamina A</b>	-0,06	0,609	-0,554	<b>&lt;0,001</b>
<b>RBP4</b>	0,101	0,394	-0,526	<b>&lt;0,001</b>
<b>Cociente A/RBP4</b>	-0,281	<b>0,017</b>	-0,053	0,659

p: Significación estadística.

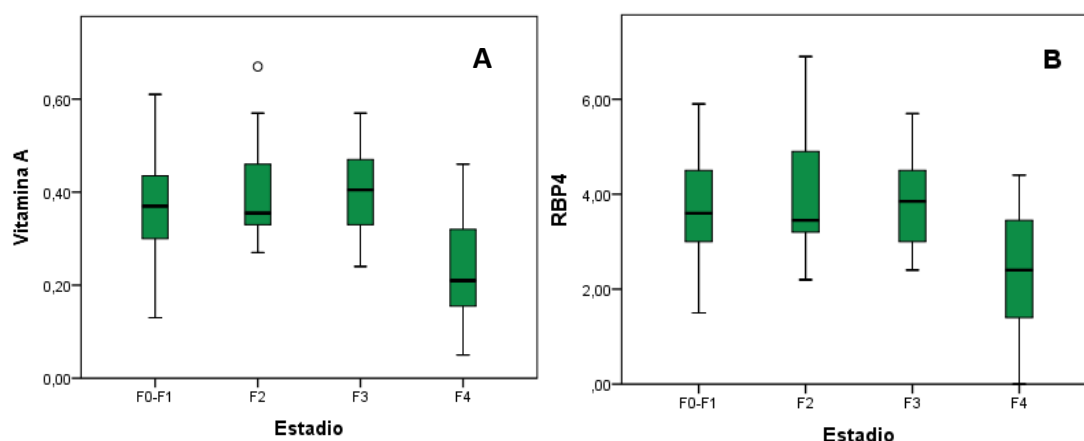


**Figura 16:** Dispersión de IL6, vitamina A (A), RBP4 (B) y LBP con cociente A/RBP4 (C).

### 2.4.3.-Vitamina A, RBP4, cociente A/RBP4 y estadio de la enfermedad

No se encontraron diferencias significativas en los valores de vitamina A, RBP4 y cociente A/RBP4 entre los pacientes con fibrosis leve-moderada y avanzada-severa. (Apéndice 3, tabla A11).

Sin embargo, al comparar los pacientes en estadio F4 con el resto, se observaron valores de vitamina A y RBP4 significativamente más bajos ( $p < 0,001$ ). (Figura 17)



**Figura 17:** Valores de vitamina A (A) y RBP4 (B) en los diferentes estadios de fibrosis hepática.

#### 2.4.4.-Vitamina A, RBP4, cociente A/RBP4 y polimorfismo *IL28B*

Se detectaron valores de vitamina A significativamente mayores en pacientes portadores del alelo T ( $p=0,021$ ). El resto de variables, no mostraron diferencias entre los genotipos de *IL28B*. (Apéndice 3, tabla A12).

#### 2.4.5.- Vitamina A, RBP4, cociente A/RBP4, esteatosis hepática y genotipo *PNPLA3*

Los valores de vitamina A, RBP4 y su cociente, no mostraron diferencias con la presencia de EH. Tampoco se encontraron diferencias en sus determinaciones en los diferentes genotipos *PNPLA3*. (Apéndice 3, Tabla A13 y A14)

#### 2.4.6.- Vitamina A, RBP4, cociente A/RBP4 y resistencia a la insulina

Existían diferencias significativas en los valores del cociente de vitamina A/RBP4, con niveles más bajos en pacientes con RI. (Tabla 27)

**Tabla 27:** Vitamina A, RBP4 y cociente A/RBP4 en los pacientes con y sin RI.

	<u>No RI</u>		<u>RI</u>		<b>P</b>
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>Vitamina A</b>	0,37	0,32-0,42	0,34	0,25-0,44	0,151
<b>RBP4</b>	3,3	2,8-4	3,5	2,52-5,45	0,986
<b>Coc A/RBP4</b>	0,8	0,72-0,85	0,71	0,63-0,76	<b>&lt;0,001</b>

Coc A/RBP4: cociente vitamina A/RBP4. RIQ: rango intercuartílico. p: Significación estadística.

### 2.4.7.- Deficiencia de vitamina A y RBP4. Relación con otras variables continuas.

A continuación se presentan los resultados estadísticamente significativos de estudios comparativos de diferentes variables del estudio entre los grupos con y sin deficiencia de vitamina A (Tabla 28). En este caso se categorizan las variables Vitamina A y RBP4 como normales o por debajo de lo normal, a diferencia con lo expuesto en la Tabla 26, en que se manejan como variables continuas.

**Tabla 28: Análisis comparativo de variables continuas por categorías (baja vs. normal) de vitamina A y RBP. Expresada en mediana (rango intercuartílico)**

Parámetro	Vitamina A			RBP4		
	< 0,30 mg/L	≥ 0,30 mg/L	P	< 3 mg/dl	≥ 3 mg/dl	P
IL6	5,71 (4,8-9,2)	3,02 (2,4-5,6)	<b>&lt;0,001</b>	5,35 (4,4-8,6)	3,13(2,1-5,5)	<b>&lt;0,001</b>
Plaquetas*	109 (53-183)	184 (149-243)	<b>&lt;0,001</b>	124 (64-183)	189 (155-244)	<b>&lt;0,001</b>
INR	1 (0,9-1,1)	0,9 (0,8-0,9)	<b>&lt;0,001</b>	0,96 (0,9-1)	0,81 (0,8-0,9)	<b>&lt;0,001</b>
Vit B <sub>12</sub>	499 (281-707)	425 (288-513)	0,125	512 (300-701)	395 (267-491)	<b>0,010</b>
Albúmina	3,9 (3,5-4,1)	4,3 (4,1-4,5)	<b>&lt;0,001</b>	4,1 (3,6-4,2)	4,46 (4,2-4,6)	<b>&lt;0,001</b>
Prealbúmina	13,2 (8,7-16,3)	22,2 (16,9-24,7)	<b>&lt;0,001</b>	14,3 (10-16,4)	22,3 (19,2-25,6)	<b>&lt;0,001</b>
Insulina	14,2 (10,2-31)	12,9 (10,1-21,7)	<b>0,024</b>	14,2(9,1-28,7)	12,5 (10,5-23,9)	0,388
HOMA	4,9 (2,6-7,3)	3,3 (2,1-6)	<b>0,022</b>	3,85 (2,-6,7)	3,2 (2,2-6,7)	0,502
Glucemia	98 (85-110,5)	93 (89,7-105,2)	0,454	96 (85-99,5)	98 (90-112)	<b>0,030</b>
Creatinina	0,82 (0,75-0,8)	0,96 (0,86-1,02)	<b>0,002</b>	0,85 (0,7-0,9)	0,97 (0,8-1,02)	<b>0,012</b>
LDH	441 (401-487)	380 (316-429)	<b>&lt;0,001</b>	428 (421-472)	370 (314-407)	<b>&lt;0,001</b>
ALT	104 (64,5-136)	58 (44,7-83,7)	<b>&lt;0,001</b>	104 (64-133)	54 (35,5-58)	<b>&lt;0,001</b>
AST	117 (62-155)	48 (35,7-64,2)	<b>&lt;0,001</b>	114 (57-154)	46 (35,5-58)	<b>&lt;0,001</b>
AST/ALT	1,06 (0,7-1,2)	0,77 (0,65-0,88)	<b>0,021</b>	0,78 (0,7-1,2)	0,78 (0,64-0,92)	0,195
F. alcalina	83 (76-116)	73 (61,7-99,7)	<b>0,003</b>	83 (76,5-118)	75,5 (63-96)	<b>0,038</b>
Colesterol	156 (140-179)	184 (156-198)	<b>0,008</b>	168 (139-179)	188 (156-204)	0,114
LDL	86,8 (41-64)	104 (39,5-64,5)	<b>0,008</b>	92 (36,7-65,2)	111 (41-63,5)	0,518
Calcio	9,3 (8,85-9,95)	9,6 (9,3-9,8)	0,078	9,3 (8,9-9,8)	9,6 (9,3-9,8)	<b>0,048</b>
Se	76 (70,5-84,5)	85 (74,7-94,2)	0,060	75 (71,2-82,5)	86,5(76-95)	<b>0,039</b>
Zn	69 (61-74)	83 (73,7-89,7)	<b>&lt;0,001</b>	72 (63,2-75,5)	83 (76-95)	<b>&lt;0,001</b>

\*Plaquetas expresadas en 10<sup>3</sup>/μl. p: Significación estadística.

## 2.5.- Análisis de vitamina D:

Se obtuvieron los valores de vitamina D en 79 pacientes. El 26,6% de ellos presentaban valores normales ( $>30$  ng/ml), el 35,4% se encontraban en rangos de insuficiencia (20-30 ng/ml) y el 38% presentaban deficiencia de vitamina D ( $<20$  ng/ml).

No se encontraron diferencias significativas con el sexo, así como tampoco existía correlación entre los valores de vitamina D sérica y la edad de los pacientes.

### 2.5.1.-Vitamina D y parámetros bioquímicos

Las únicas variables continuas con las que se detectaron correlaciones significativas, todas ellas directas, fueron las concentraciones de creatinina, T3 libre, prealbúmina, vitamina A y proteína ligadora de retinol (RBP4) (Tabla 29).

**Tabla 29:** Coeficientes de correlación de la vitamina D con diferentes parámetros bioquímicos.

	Vitamina D	
	Rho	p
Creatinina	0,337	0,002
T3L	0,287	0,018
Prealbúmina	0,238	0,039
Vitamina A	0,267	0,017
RBP4	0,251	0,025
Cociente vitamina A/RBP4	0,237	0,038

rho: Coeficiente de correlación de Spearman. p: Significación estadística.

### 2.5.2.-Vitamina D e inflamación

No se detectaron correlaciones significativas entre los valores de vitamina D, IL6 ni LBP (Apéndice 3; Tabla A15).

### 2.5.3.-Vitamina D y estadio de la enfermedad

En nuestro estudio no se apreciaron diferencias en la cuantificación de vitamina D en los pacientes afectados de un mayor grado de fibrosis. (Apéndice 3; Tabla A16).



#### 2.5.4.-Vitamina D y genotipo *IL28B*

La distribución de los valores de vitamina D en los pacientes portadores y no portadores del alelo T de *IL28B* no mostró diferencias significativas. (Apéndice 3; Tabla A17).

#### 2.5.5.-Vitamina D, esteatosis hepática y genotipo *PNPLA3*

No se detectaron diferencias en los valores de vitamina D en los pacientes con y sin EH. Tampoco existía significación estadística en los diferentes genotipos de *PNPLA3* (Apéndice 3; Tabla A18 y A19).

#### 2.5.6.-Vitamina D y resistencia a la insulina

No existían diferencias significativas en los valores de vitamina D en los pacientes con y sin RI. (Apéndice 3; Tabla A20).

#### 2.5.7.- Insuficiencia y deficiencia de vitamina D. Relación con otras variables continuas.

A continuación se presentan los resultados estadísticamente significativos de estudios comparativos de diferentes variables entre los grupos con y sin deficiencia (Tabla 30).

**Tabla 30:** Análisis comparativo de variables continuas por categorías (deficiencia, insuficiencia y normal) de vitamina D. Comparación mediante el test de Kruskal-Wallis.

	Normal		Insuficiencia		Deficiencia		p
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>M. magra</b>	12,5	8,9-16,9	12,6	7,5-15,2	8,25	6,8-11,9	<b>0,037</b>
<b>Agua IC</b>	30,9	25,4-33,8	30,9	25,5-33,6	26,85	22,6-30,4	<b>0,017</b>
<b>INR</b>	0,85	0,8-0,9	0,9	0,9-1	0,9	0,8-0,9	<b>0,042</b>
<b>Creatinina</b>	1,01	0,84-1,06	0,97	0,82-1,02	0,84	0,78-0,93	<b>0,010</b>
<b>T3L</b>	3,38	3-3,66	3,19	2,93-3,45	3,08	2,92-3,28	<b>0,048</b>
<b>Vit. A</b>	0,4	0,3-0,51	0,36	0,26-0,41	0,34	0,2-0,39	<b>0,049</b>

RIQ: Rango intercuartílico. M. magra: masa magra. Agua IC: Agua intracelular. Vit. A: Vitamina A. p: Significación estadística.

## 2.6.- Análisis de los fenotipos de DBP:

Se realizó el estudio de fenotipos de DBP en 76 pacientes. Se apreció una distribución diferente en hombres y mujeres de los distintos fenotipos con una significación estadística en el límite ( $p=0,049$ ).

### 2.6.1.- Fenotipo DBP y vitamina D

No se detectaron diferencias significativas en los niveles séricos de vitamina D en los diferentes fenotipos de DBP. (Apéndice 3; tabla A21).

### 2.6.2.- Fenotipo DBP y parámetros bioquímicos

En la siguiente tabla (Tabla 31) se resumen los parámetros bioquímicos que mostraron diferencias significativas entre los diferentes fenotipos de DBP.

**Tabla 31:** Parámetros bioquímicos relacionados significativamente con los fenotipos DBP.

Fenotipo DBP					
	Gc1S/Gc1S (23 casos)		Otros (56 casos)		p
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
Sideremia	140	118-173	112	78,5-142	0,011
Ferritina	267,9	129-510	132,6	69,4-219	0,006
Creatinina	0,96	0,9-1,01	0,85	0,78-0,99	0,021
Cistatina C	0,96	0,9-1,1	0,90	0,77-1	0,031
Ácido úrico	6	5,3-6,6	4,9	4,4-6,15	0,005
TSH	1,7	1,32-2,66	1,41	0,99-2,13	0,049

RIQ: rango intercuartílico. p: Significación estadística.

### 2.6.3.- Fenotipo DBP y composición corporal

Se objetivaron diferencias significativas en el IMC, masa grasa y agua extracelular entre los fenotipos Gc1S/Gc1S y el resto. (Tabla 32).

**Tabla 32:** Parámetros antropométricos relacionados significativamente con los fenotipos DBP.

<u>Fenotipo DBP</u>					
	Gc1S/Gc1S (23 casos)		Otros (56 casos)		p
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
IMC	28,2	24,5-29,9	25,5	22,9-27,3	0,038
% graso	26,8	23,1-43,4	30,3	24,3-39,5	0,291
% muscular	73,2	56,6-76,8	69,7	60,4-75,7	0,291
Masa magra	13,2	8,85-16,8	9,1	7,4-13,3	0,014
Agua total	53,9	46,8-56,6	54,2	49,9-57,1	1
Agua IC	30,5	24,2-32,05	27,6	25,4-32,35	0,211
Agua EC	23,1	21,5-24,25	24,2	22,75-27,1	0,021

RIQ: rango intercuartílico. p: Significación estadística.

#### **2.6.4.- Fenotipo DBP y estadio de la enfermedad**

El 60,9 % de los enfermos con fenotipo Gc1S/Gc1S y el 52,8 % de los portadores de los otros fenotipos tenían fibrosis avanzada (F3-F4). La diferencia no es significativa ( $p = 0,517$ )

#### **2.6.5.- Fenotipo DBP y esteatosis hepática**

El 27,3% de los pacientes con fenotipo Gc1S/Gc1S presentaban EH. Del resto de los fenotipos, un 18,9% presentaban EH. La diferencia no es significativa ( $p=0,537$ ).

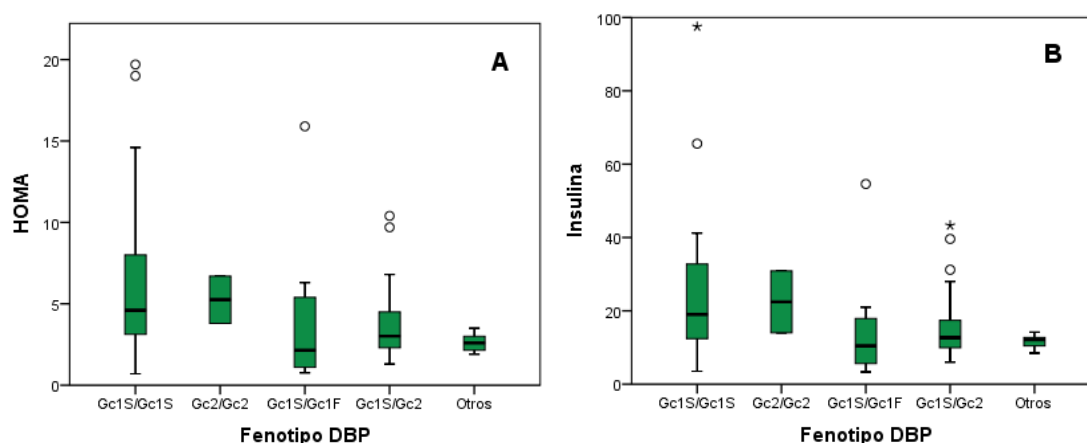
#### **2.6.6.-Fenotipo DBP y RI**

Los sujetos portadores del fenotipo Gc1S/Gc1S presentaban valores significativamente más altos de HOMA y de insulinemia que el resto de los pacientes, tanto como conjunto como clasificados por fenotipos DBP. (Tabla 33. Figura 18). De la misma forma, el fenotipo Gc1s/Gc1S presentaba una relación significativa con la existencia de RI (OR 1,56; IC 95% 1,078-2,278;  $p=0,031$ ).

**Tabla 33:** HOMA e insulinemia en los diferentes fenotipos DBP, comparación con valores de fenotipo Gc1S/Gc1S.

	HOMA		P	INSULINA		p
	Mediana	RIQ		Mediana	RIQ	
<b>Gc1S/Gc1S (23)</b>	4,6	2,8-8,1		19	12,4-37,1	
<b>Gc1S/Gc1F (14)</b>	2,15	1,07-5,5	<b>0,036</b>	10,45	5,42-18,32	<b>0,017</b>
<b>Gc1S/Gc2 (30)</b>	3,01	2,27-4,52	<b>0,023</b>	12,7	9,79-15,57	<b>0,021</b>
<b>Gc2/Gc2 (2)</b>	5,25	n.e.	1	22,45	n.e.	0,920
<b>Otros (7)</b>	2,7	2,22-3,27	<b>0,014</b>	10,8-13,2	2,4	<b>0,023</b>
<b>Todos no Gc1S/Gc1S</b>	2,8	2,05-4,55	<b>0,006</b>	12,5	9,23-17,05	<b>0,005</b>

RIQ: rango intercuartílico. p: Significación estadística. n.e: no estimable.



**Figura 18:** Valores de HOMA (A) y de insulina (B) para los diferentes fenotipos de DBP.

### **3.- VALORACIÓN DEL ESTADO INFLAMATORIO SISTÉMICO:**

#### **3.1.- Marcadores séricos inespecíficos**

Se consideran como tales las concentraciones de ferritina, fibrinógeno y ceruloplasmina en plasma. Se dispone de determinaciones de los dos primeros en los 79 sujetos de la serie. En cuanto a la ferritina, el 26,3 % de los hombres, con valores superiores a 350 ng/ml, y el 10,8 % de las mujeres, con valores superiores a 300 ng/dl, tenían concentraciones de esta proteína por encima del límite superior de la normalidad. En cuanto al fibrinógeno, el 16,5 % de los pacientes tenían valores superiores a 400 mg/dl, sin diferencia entre sexos.

La ceruloplasmina está disponible en 68 pacientes, sin que se aprecien valores por encima del límite máximo de la normalidad.

#### **3.2.- Análisis de LBP e IL6:**

Se realizó la cuantificación de LBP e IL6 en 74 pacientes. No se detectaron diferencias ni por sexo ni por edad en los valores obtenidos.

##### **3.2.1.-LBP, IL6 y parámetros bioquímicos**

Los valores de mediana y RIQ de ambos parámetros se muestran en la Tabla 8. Veinte pacientes (27 %) tenían valores de LBP superiores al límite máximo de la normalidad y 11 pacientes (14,9 %) tenían valores de IL6 que también superaban este límite.

Tanto la IL6 como la LBP se relacionaban de forma significativa con múltiples parámetros bioquímicos analizados en este estudio (Tabla 34)

**Tabla 34:** Coeficientes de correlación LBP e IL6 con diferentes parámetros bioquímicos.

	<u>LBP</u>		<u>IL6</u>	
	Rho	P	Rho	P
Fibrinógeno	0,364	<b>0,001</b>	-0,148	0,208
Albúmina	-0,039	0,745	-0,490	<b>&lt;0,001</b>
Glucosa	0,289	<b>0,013</b>	0,180	0,125
HOMA	0,279	<b>0,016</b>	0,406	<b>&lt;0,001</b>
Insulina	0,247	<b>0,034</b>	0,379	<b>0,001</b>
AST	0,116	0,323	0,372	<b>0,001</b>
Fosfatasa alcalina	0,233	<b>0,046</b>	0,303	<b>0,009</b>
Bilirrubina total	-0,061	0,606	0,308	<b>0,008</b>
HDL	-0,073	0,526	-0,310	<b>0,007</b>
Se	-0,156	0,188	-0,409	<b>&lt;0,001</b>
Prealbúmina	-0,065	0,593	-0,510	<b>&lt;0,001</b>
Vitamina A	-0,060	0,609	-0,554	<b>&lt;0,001</b>
RBP4	0,101	0,394	-0,526	<b>&lt;0,001</b>
Cociente A/RBP4	-0,281	<b>0,017</b>	-0,053	0,659

rho: Coeficiente de correlación de Spearman. p: Significación estadística.

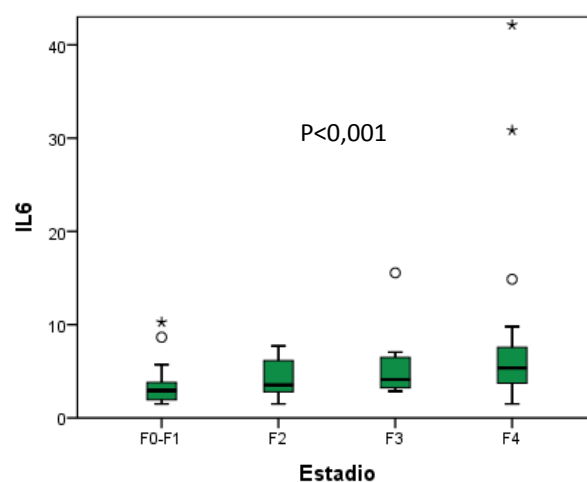
### 3.2.2.-LBP, IL6 y estadio de la enfermedad

Se detectaron diferencias significativas en los valores de IL6, en estadios avanzados se apreciaban valores mayores de esta interleucina que en estadios precoces. Para la LBP, no se encontraron diferencias significativas en los diferentes grados de fibrosis. (Tabla 35. Figura 19)

**Tabla 35:** LBP e IL6 en los diferentes estadios evolutivos.

	<u>F0-F2</u>		<u>F3-F4</u>		P
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>LBP</b>	7,12	5,61-8,32	7,37	5,79-9,78	0,450
<b>IL6</b>	2,93	1,92-4,19	5,14	2,97-6,51	<b>0,001</b>

RIQ: rango intercuartílico. p: Significación estadística.



**Figura 19:** Valores de IL6 en los diferentes estadios de fibrosis hepática.

### 3.2.3.-LBP, IL6 y genotipo *IL28B*

No existieron diferencias significativas en los valores de IL6 y LBP entre los sujetos portadores del alelo T de la *IL28B* y los portadores del genotipo CC. (Apéndice 3, Tabla A21)

### 3.2.4.-LBP, IL6, esteatosis hepática y genotipo *PNPLA3*

Se detectaron diferencias significativas en los valores de LBP. Los pacientes con EH presentaban cifras mayores que aquellos sin EH. No se observaron estas diferencias en el caso de la IL6. (Tabla 36)

**Tabla 36:** LBP e IL6 en la esteatosis hepática.

	<u>No EH</u>		<u>EH</u>		P
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>LBP</b>	6,96	5,56-8,13	8,51	7,3-10,17	<b>0,009</b>
<b>IL6</b>	3,81	2,82-5,72	3,45	1,64-6,18	0,378

RIQ: rango intercuartílico. p: Significación estadística.

No existían diferencias en los valores de IL6 y LBP para los diferentes genotipos *PNPLA3*. (Apéndice 3; Tabla A22).

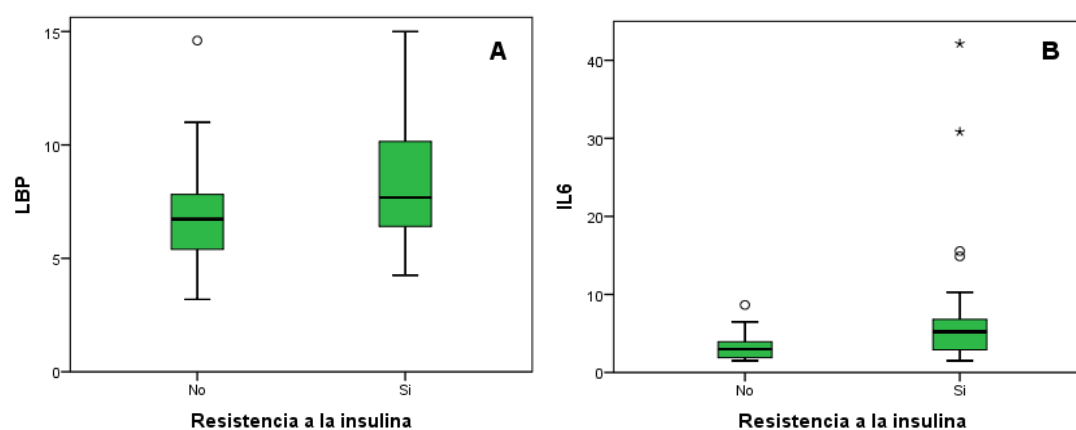
### 3.2.5.-LBP, IL6 y resistencia a la insulina

Se objetivaron valores significativamente mayores de IL6 y LBP en pacientes que presentaban RI. (Tabla 37. Figura 20)

**Tabla 37:** LBP e IL6 en la RI.

	<u>No RI</u>		<u>RI</u>		<b>P</b>
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>LBP</b>	6,73	5,34-7,83	7,68	6,38-10,17	<b>0,018</b>
<b>IL6</b>	2,98	1,8-4	5,22	2,9-6,92	<b>0,001</b>

RIQ: rango intercuartílico. p: Significación estadística.



**Figura 20:** Valores de LBP (A) e IL6 (B) y resistencia a la insulina.

Se detectaron correlaciones significativas tanto para IL6 como para LBP con los valores de insulina e HOMA. (Tabla 38. Figura 21)

**Tabla 38:** Coeficientes de correlación entre IL6, LBP, HOMA e insulinemia.

	<b>LBP</b>		<b>IL6</b>	
	r (Spearman)	P	r (Spearman)	P
<b>HOMA</b>	0,379	<b>0,001</b>	0,406	<b>&lt;0,001</b>
<b>Insulina</b>	0,247	<b>0,034</b>	0,279	<b>0,016</b>

p: Significación estadística.



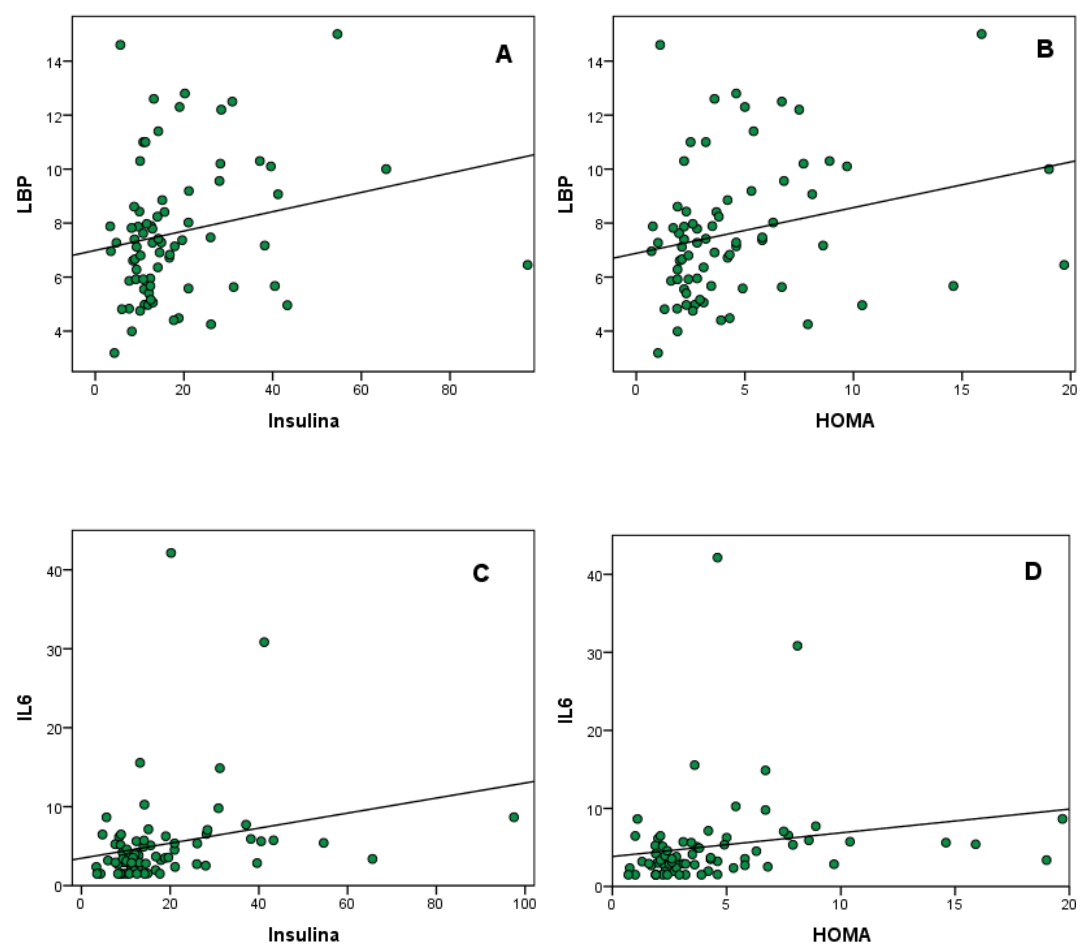


Figura 21: Gráficos de dispersión de LBP, Insulina (A), HOMA (B), y de IL6 con insulina (C) y HOMA (D).

#### 4.- ANÁLISIS DE LA ESTEATOSIS HEPÁTICA EN LA HCC:

Se recogieron los datos de 78 pacientes respecto a la existencia o no de EH, ya fuera valorada por ecografía (n=47) o por biopsia hepática (n=31). No se detectaron diferencias significativas respecto a la edad o el sexo y la presencia de EH.

##### 4.1.- Esteatosis hepática y parámetros bioquímicos.

El único dato analítico que presentaba diferencias significativas respecto a la presencia de EH fue la GGT, con valores más elevados en los pacientes con EH (p=0,010). (Apéndice 3; Tabla A24).

##### 4.2.- Esteatosis hepática y estadio de la enfermedad

No se detectaron diferencias significativas respecto a la presencia de EH en los diferentes estadios de la enfermedad (OR 2,48; IC 95% 0,779-7,89).

##### 4.3.- Esteatosis hepática y genotipo *IL28B*

La frecuencia de EH no fue estadísticamente diferente en ninguno de los tres genotipos/*IL28B* (OR 1,48; IC 95% 0,37-5,92).

##### 4.4.- Esteatosis hepática y resistencia a la insulina

Los pacientes con EH presentaban en mayor proporción RI (OR 5,14; IC 95% 1,34-19,75).

De la misma forma, se encontraron diferencias en los valores de HOMA e insulina en los pacientes con y sin EH. (Tabla 39. Figura 22)

**Tabla 39:** Valores de insulina y HOMA en la esteatosis hepática.

	<u>No EH</u>		<u>EH</u>		<b>P</b>
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>Insulina</b>	12,4	9,48-18,35	18,1	14,55-29,65	<b>0,006</b>
<b>HOMA</b>	2,8	2,15-4,6	4,7	3,44-7,6	<b>0,007</b>

RIQ: rango intercuartílico. p: Significación estadística.

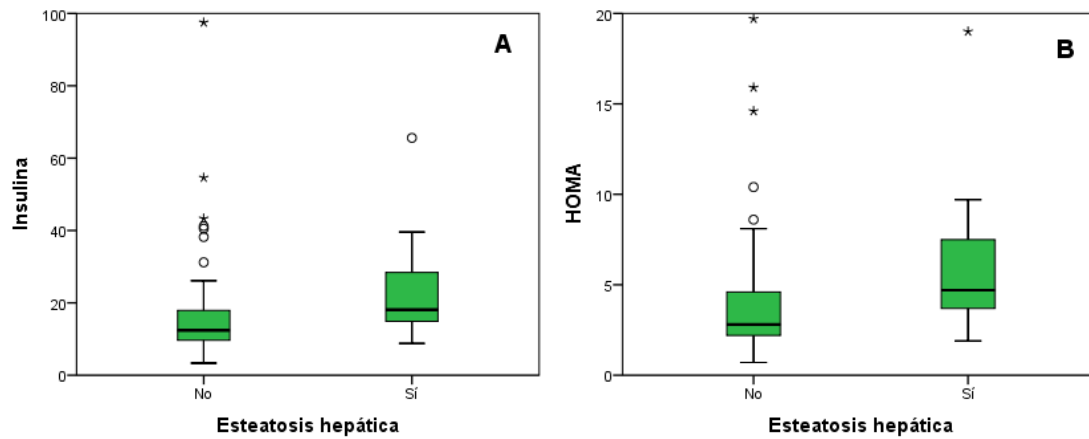


Figura 22: Valores de insulina (A) y HOMA (B) en la esteatosis hepática.

#### 4.5.- Análisis del polimorfismo *PNPLA3*:

Se realizó el estudio del polimorfismo *PNPLA3* en 79 pacientes. No se detectaron diferencias significativas respecto al sexo ni a la edad en los diferentes genotipos

##### 4.5.1.-Genotipo *PNPLA3* y estadio de la enfermedad

Existían diferencias significativas en las frecuencias de los diferentes genotipos *PNPLA3* y los estadios de enfermedad agrupados en fibrosis leve-moderada vs avanzada-severa ( $p=0,024$ ). (Figura 23)

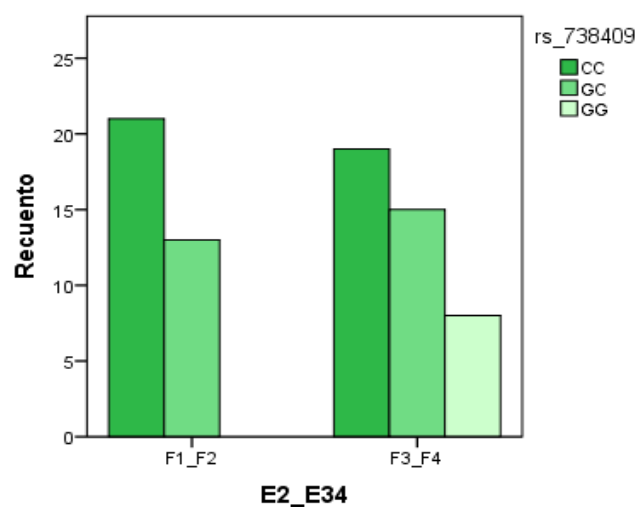


Figura 23: Estadio de fibrosis según el genotipo de *PNPLA3*.

#### 4.5.2.- Genotipo *PNPLA3* y genotipo *IL28B*

No se apreciaron diferencias significativas entre el estado de portador del alelo G de *PNPLA3* y la presencia o no del alelo T en el genotipo *IL28B* ( $p=0,349$ ; OR 1,707 IC 95% 0,55-5,25).

#### 4.5.3.- Genotipo *PNPLA3* y esteatosis hepática

En nuestro estudio, no se detectó una asociación entre la presencia del alelo mutado G de *PNPLA3* y la existencia de EH ( $p=0,456$ ; OR 1,52 IC95% 0,501-4,63).

#### 4.5.4.- Genotipo *PNPLA3* y resistencia a la insulina

La distribución de los diferentes genotipos de *PNPLA3* no mostraba diferencias significativas respecto a la existencia de RI ( $p=0,610$ ; OR 1,267 (0,51-3,14).

## 5.- ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA EN LA HCC:

Se realizó la cuantificación de HOMA e insulinemia en los 79 pacientes incluidos. Un 55,7% (n=44) de ellos presentaban valores de HOMA en el rango de RI. No se detectaron diferencias significativas por sexo ni por edad.

### 5.1.- Resistencia a la insulina y parámetros bioquímicos.

En la siguiente tabla se muestran las variables continuas estadísticamente relacionadas con la RI (Tabla 40).

**Tabla 40:** Parámetros bioquímicos en la RI.

	<u>No RI</u>		<u>RI</u>		<b>P</b>
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>Cistatina C</b>	0,83	0,75-0,95	0,97	0,9-1,1	<b>&lt;0,001</b>
<b>Ácido úrico</b>	4,75	4,27-5,22	5,95	5,2-6,6	<b>&lt;0,001</b>
<b>ALT</b>	56	36,5-85	73,5	53-105	<b>0,042</b>
<b>AST</b>	47	35-58	60,5	43,7-114,2	<b>0,013</b>
<b>GGT</b>	41,5	31-75,2	85	46,5-144,7	<b>0,006</b>
<b>Bilirrubina</b>	0,65	0,5-0,9	0,8	0,6-1,12	<b>0,029</b>
<b>Triglicéridos</b>	78	68,5-105,75	95	76,25-143,7	<b>0,014</b>
<b>TSH</b>	1,28	1,01-1,79	1,71	1,31-2,55	<b>0,030</b>

RIQ: rango intercuartílico. p: Significación estadística.

### 5.2.- Resistencia a la insulina y estadio de la enfermedad.

La RI mostraba una relación estadísticamente significativa con el estadio de progresión de la enfermedad hepática, con una OR=5,81 (IC 95% 2,19-15,41).

### 5.3.- Análisis multivariado: Resistencia a la Insulina.

Tras el análisis univariado de las múltiples variables incluidas en nuestro estudio se objetivó que la RI era la variable más representativa, por lo que se procedió a realizar un análisis multivariado de regresión logística en el que se seleccionó la RI. como variable dependiente.

Ante el alto número de variables que presentaban diferencias significativas entre los grupos de pacientes con y sin RI (Apéndice 3; tabla A25), se seleccionaron aquellas

que presentaban mayor evidencia científica de relación con la RI y aquellas que consideramos relevantes e innovadoras por parte de nuestro estudio (Tabla 41). Del mismo modo, aunque en el análisis univariado no mostraban diferencias significativas, se incluyeron el sexo y la edad como variables independientes.

**Tabla 41:** Variables incluidas en el análisis multivariado de la resistencia a la insulina.

Variable	P
Sexo	0,199
Edad	0,107
Grasa corporal	0,037
Agua extracelular	<0,001
Cociente A/RBP4	<0,001
IL6	0,001
Esteatosis hepática	0,013
Fibrosis (F0-1 vs F2-4)	<0,001
Cistatina C	<0,001
IMC	<0,001
Ácido Úrico	<0,001
Triglicéridos	0,014

p: Significación estadística.

El análisis multivariado mostró como factores asociados a la RI las siguientes variables: sexo, edad, IL6, agua extracelular, cociente vitamina A/RBP4 y presencia de EH. (Tabla 42).

**Tabla 42 :**Resultado del análisis multivariado de la resistencia a la insulina.

Variable	P univariado	Análisis multivariado	
		OR (IC 95 %)	P
Sexo	0,199	<b>10,93 (1,42-84,17)</b>	<b>0,010</b>
Edad	0,107	<b>1,18 (1,04-1,34)</b>	<b>0,001</b>
IMC	< 0,001	0,900 (0,61-1,31)	0,662
Grasa corporal	0,037	1,01 (0,89-1,35)	0,445
Agua extracelular	< 0,001	<b>0,83 (0,71-0,97)</b>	<b>0,019</b>
IL6	0,001	<b>2,60 (1,37-4,96)</b>	<b>&lt; 0,001</b>
Cistatina C	< 0,001	2,16 (0,002-2579)	0,683
Ácido úrico	< 0,001	1,27 (0,60-2,68)	0,231
Triglicéridos	0,014	<b>1,02 (1,00-1,048)</b>	<b>0,003</b>
Cociente Vit A/RBP	< 0,001	<b>0,00 (0,00-0,07)</b>	<b>0,001</b>
Esteatosis hepática	0,013	<b>38,49 (2,08-710)</b>	<b>0,003</b>
Fibrosis (F0-1 vs. F2-4)	< 0,001	3,49 (0,64-19,09)	0,137

OR: Odds ratio. IC: intervalo de confianza. p: Significación estadística.

Los resultados del test de bondad de ajuste mediante la prueba de *Hosmer-Lemeshow* mostraron una adecuada calibración del modelo ( $p=0,717$ ), es decir, no encontramos diferencias entre el modelo observado en nuestra muestra frente a lo esperado.

El poder de clasificación adecuado del modelo, estimado mediante curva ROC a partir de las probabilidades predichas fue del 94,1% (IC 95% 0,892-0,991). Tomando como punto de corte discriminativo un valor de 0,55 se obtienen valores de sensibilidad y de especificidad de 0,881 y de 0,867 respectivamente, para la identificación de RI. (Figura 24)

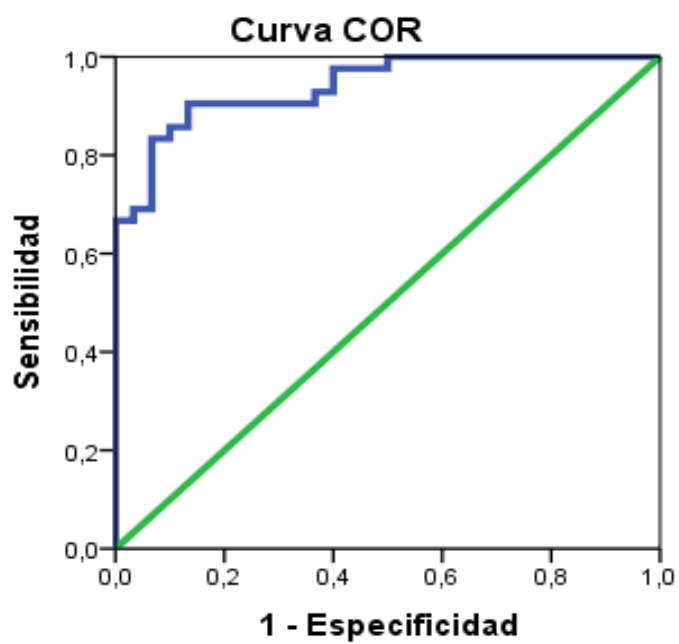


Figura 24: Curva COR para la RI según el modelo predictivo.



## **6.- ANÁLISIS DE LA FIBROSIS EN LA HCC:**

Se recogieron los datos sobre el estadio de fibrosis de la HCC en la totalidad de los sujetos. Un total de 32 pacientes (40%) habían sido sometidos a una biopsia hepática a lo largo del seguimiento de su enfermedad, si bien solamente 11 sujetos (13%) poseían resultados anatomopatológicos en los tres años previos a la inclusión en el estudio. En el resto de los pacientes se tomó como referencia los resultados del fibroscan más cercano a la fecha de inclusión, que en ningún caso podía exceder un periodo de tres años (criterio de inclusión).

No se detectaron diferencias significativas en la distribución de los diferentes estadios entre los dos sexos, si bien en el análisis agrupado de fibrosis leve-moderada frente a fibrosis avanzada-severa, se apreció que los varones presentaban mayor grado de fibrosis que las mujeres (OR 3,059; IC 95% 1,21-7,70).

Respecto a la edad, no existían diferencias significativas entre los diferentes estadios de la enfermedad.

### **6.1.- Fibrosis hepática y parámetros bioquímicos.**

En la siguiente tabla se muestran las variables continuas estadísticamente relacionadas con el estadio de fibrosis, clasificada por F0-F2 y F3-F4 (Tabla 43).

**Tabla 43:** Parámetros bioquímicos en la fibrosis hepática.

	F0-F2		F3-F4		P
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>Plaquetas*</b>	198	162-243	145	108-212	<b>&lt;0,007</b>
<b>INR</b>	0,8	0,8-0,9	0,9	0,9-1,1	<b>0,003</b>
<b>Vitamina B12</b>	405	250-499	464,5	310-569	<b>0,035</b>
<b>Albúmina</b>	4,4	4,2-4,6	4,2	3,9-4,4	<b>0,008</b>
<b>Cistatina C</b>	0,84	0,75-0,94	0,97	0,89-1,09	<b>0,001</b>
<b>Ácido Úrico</b>	4,8	4,4-5,7	5,65	4,9-6,65	<b>0,002</b>
<b>ALT</b>	58	41,2-72,5	85,5	54-108	<b>0,001</b>
<b>AST</b>	46	35,2-54	71,5	46,5-110	<b>&lt;0,001</b>
<b>GGT</b>	40	31-66,7	86	47-141	<b>0,001</b>
<b>Fosfatasa alcalina</b>	72	59,5-87,7	88,5	68,5-113	<b>0,015</b>
<b>Bilirrubina</b>	0,6	0,4	0,8	0,6	<b>0,043</b>
<b>Colesterol</b>	188	166-212	166,5	150-192	<b>0,027</b>
<b>HDL</b>	60	69,2-96,5	49	73-145	<b>0,010</b>
<b>Triglicéridos</b>	76	69,2-96,5	91	73-145	<b>0,038</b>
<b>TSH</b>	1,32	0,97-1,67	1,92	1,26-2,55	<b>0,011</b>

RIQ: rango intercuartílico. p: Significación estadística.

\*Plaquetas expresadas en  $10^{12}/l$ .

## 6.2.- Análisis multivariado: Fibrosis hepática.

La distribución del estadio de fibrosis, de acuerdo con el sistema METAVIR, queda reflejada en la Tabla 4. Se ha considerado la fibrosis como variable dicotómica, clasificada como fibrosis nula-moderada (F0-F2) y fibrosis avanzada (F3-F4). Se ha realizado análisis comparativo de las variables incluidas en este estudio. En la Tabla 44 se muestran los resultados cuyas diferencias son significativas a un nivel  $\leq 0,01$ , con las

excepciones de sexo que se ha incluido por que el masculino es un factor bien conocido asociado al riesgo de fibrosis avanzada.

**Tabla 44:** Variables incluidas en el análisis multivariado de la fibrosis hepática.

Variable	P
Sexo	0,016
Edad	0,386
Portador alelo G <i>PNPLA3</i>	0,004
IL6	0,001
Plaquetas	0,007
INR	0,003
Albúmina	0,008
HOMA	<0,001
Cistatina C	0,001
Ácido Úrico	0,002
ALT	0,001
AST	<0,001
GGT	<0,001
HDL	0,010
TSH	0,011

p: Significación estadística.

El análisis multivariado mostró como factores asociados a la RI las siguientes variables: sexo, estado de portador del alelo G de *PNPLA3*, albúmina sérica, índice HOMA, cistatina C y concentración de AST (Tabla 45).

**Tabla 45:** Resultado del análisis multivariado de la fibrosis avanzada.

Variable	P univariado	Análisis multivariado	
		OR (95 % IC)	P
Sexo	0,016	<b>11,72 (2,38-57,69)</b>	<b>0,001</b>
Edad	0,386	1,02 (0,93-1,11)	0,412
Portador alelo G <i>PNPLA3</i>	0,004	<b>5,33 (1,17-24,13)</b>	<b>0,019</b>
IL6	0,001	1,06 (0,77-1,47)	0,750
Plaquetas	0,007	1,00 (1,00-1,00)	0,706
INR	0,003	16,04 (0,06-4260)	0,455
Albúmina	0,008	<b>0,029 (0,002-0,36)</b>	<b>0,002</b>
HOMA	<0,001	<b>1,53 (1,02-2,28)</b>	<b>0,007</b>
Cistatina C	0,001	<b>150,5 (0,97-23256)</b>	<b>0,045</b>
Ácido Úrico	0,002	1,54 (0,80-2,95)	0,186
ALT	0,001	<b>1,01 (1,001-1,02)</b>	<b>0,018</b>
AST	<0,001	0,99 (0,94-1,05)	0,550
GGT	<0,001	1,00 (0,99-1,01)	0,903
HDL-colesterol	0,010	0,99 (0,92-1,02)	0,275
TSH	0,011	1,43 (0,47-3,19)	0,389

OR: Odds ratio. IC: intervalo de confianza. p: Significación estadística.

Se ha generado un modelo con los 6 factores que mantienen diferencias significativas en el análisis multivariado, lo que permite elaborar una curva ROC con un área bajo curva de 0,910 (IC 95% 0,846-0,975). Tomando como punto de corte discriminativo un valor de 0,54 se obtienen valores de sensibilidad y de especificidad de 0,83 y de 0,76 respectivamente, para la identificación de fibrosis avanzada.

Los resultados del test de bondad de ajuste mediante la prueba de *Hosmer-Lemeshow* mostraron una adecuada calibración del modelo ( $p=0,229$ ), es decir, no encontramos diferencias entre el modelo observado en nuestra muestra frente a lo esperado. (Figura 25)

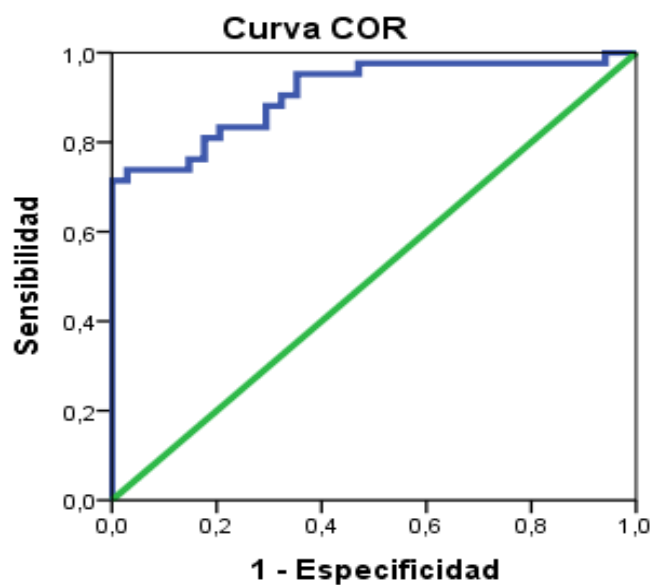


Figura 25: Curva COR para la fibrosis avanzada según el modelo predictivo diseñado.

Se ha calculado el índice APRI, como contraste para este modelo, con un área bajo curva de 0,741 (95 % I.C. 0,629-0,852) sensiblemente inferior a la generada por el modelo que se propone ( $p < 0,050$ ). (Figura 26)

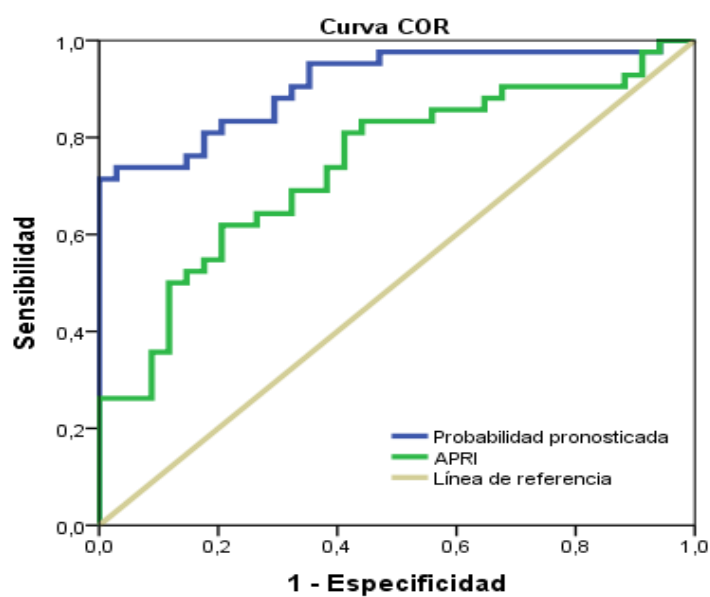


Figura 26: Curva COR comparativa entre el modelo predictivo diseñado y el índice APRI.

## **VI.- DISCUSIÓN**



## VI.- DISCUSIÓN

Los mecanismos patogénicos de la infección por VHC y la respuesta fisiopatológica del organismo son complejos y altamente variables, resultantes de la interacción de múltiples factores que dependen del virus (ya de por sí poco predecible), del estado nutricional global como garante de un sustrato adecuado para la defensa antiinfecciosa, de la disponibilidad de diversos micronutrientes implicados en la misma, de la organización de la respuesta inflamatoria específica del individuo, del metabolismo intermediario y de los factores hormonales que lo controlan, sin olvidar que el polimorfismo genético influye en muchos de estos factores. Cada uno de estos aspectos ha sido evaluado de forma individual por numerosos estudios de calidad metodológica muy variable, cuyos resultados proporcionan una visión muy fragmentada de un conjunto mal definido, con múltiples redundancias y contradicciones. En un sistema tan complejo como el organismo humano (y no solo el hígado) infectado por el VHC es altamente improbable que la sucesión de fenómenos patobiológicos sea lineal y unidireccional. Más bien estamos ante una red de fenómenos interrelacionados que se articulan para dar lugar finalmente a un conjunto reducido de vectores evolutivos cuya dirección final predominante será la que determine si el organismo va a ser capaz de eliminar el virus por sí solo (algo improbable en la infección crónica) o con ayuda del tratamiento, o si va a permanecer infectado indefinidamente, ya sea en una situación de relativo equilibrio que permitirá una evolución muy prolongada sin llegar al daño hepático avanzado, o de marcada agresividad que conduzca en pocos años a la cirrosis y eventualmente al CHC.

Este estudio se ha diseñado para dar soporte práctico a este planteamiento integrador, seleccionando una gama de objetivos exploratorios que podemos considerar como nodos situados en puntos distantes de esa red determinista de la evolución de la enfermedad, tratando de establecer sus vías de confluencia hasta llegar a la encrucijada situada en el lugar o lugares donde se va a decidir principalmente el destino final de la enfermedad. A la vista de los resultados de este estudio hemos considerado que este punto crítico, o al menos el más relevante de los varios que se pueden identificar, es la RI.



La selección de los parámetros ha sido lo más amplia posible, cubriendo el mayor número posible de facetas de la enfermedad. Las limitaciones de este estudio son obvias en lo relativo al tamaño muestral ya que a cada paciente se le ha sometido a un estudio muy amplio que ha necesitado de la intervención de recursos instrumentales (impedanciometría, fibroscán y/o biopsia hepática, ecografía) y analíticos (bioquímica general y especial, determinación de citocinas, estudio de polimorfismos genéticos, etc) que ha involucrado a numerosos expertos de varios centros, sin apenas financiación específica.

Cada uno de los parámetros incluidos se ha discutido por separado a la luz de los datos publicados. A continuación se ha identificado como suceso central en la patogenia de la enfermedad la RI, sobre la que se ha elaborado un análisis multivariado orientado a identificar cuáles son los factores más estrechamente relacionados con la misma y en lo posible, el grado de causalidad.

La fibrosis hepática es el principal elemento pronóstico en la infección crónica por el VHC y se han realizado muchos intentos para tratar de evaluarla por métodos indirectos no invasivos. Este estudio ha permitido identificar algunos factores relacionados con la misma cuya integración en un modelo matemático predictivo proporciona una elevada sensibilidad y especificidad; este modelo es solo una propuesta preliminar y ha de ser contrastado en una casuística mucho mayor, pero permite inferir que un estudio traslacional como el que aquí se presenta puede generar resultados con aplicación en la práctica clínica.

Con el fin de facilitar la identificación de resultados referidos a elementos individuales del estudio, se ha utilizado la misma estructura en sus diferentes apartados, de modo que quien esté interesado en un solo aspecto pueda extraer lo referente al mismo desde la introducción hasta la discusión y, en lo posible, la bibliografía.

## 1.- ASPECTOS NUTRICIONALES DE LA HCC:

### 1.1.- Parámetros antropométricos:

Disponemos de la realización de BIA corporal en 74 pacientes, ya que en el resto se obtuvieron resultados anómalos en relación con la posesión de prótesis o material de ortosíntesis metálico y 1 paciente no se realizó el estudio. Se encontraron diferencias significativas entre la composición corporal de los hombres, con mayor componente muscular y de agua, y las mujeres, con mayor porcentaje graso. A su vez, se detectó que la edad se asocia con mayores cifras de porcentaje graso y menor porcentaje muscular junto con una menor cantidad de agua corporal (total e intracelular). Estos datos concuerdan con lo establecido en la población general, por la influencia de las hormonas femeninas en el caso de las diferencias entre sexos y el envejecimiento celular respecto a la edad.

Dentro de las **variables bioquímicas** estudiadas, la creatinina, la prealbúmina y el ácido úrico demostraron una correlación directa con la masa muscular, como era esperado. Los niveles de colesterol HDL se relacionaban de forma significativa con el componente graso corporal. El Zn mostraba también una asociación directa con el porcentaje graso, explicable por ser el tejido adiposo el lugar de depósito de este oligoelemento. Por el contrario, la vitamina A, aunque también se deposita en este tejido, mostraba una correlación negativa con la grasa corporal mientras que se relacionaba de forma positiva con el músculo y el agua corporal total. No encontramos referencias bibliográficas que expliquen estos últimos resultados, así como el por qué de la relación de las cifras de vitamina D con el agua intracelular y la masa magra.

Se encontró una correlación directa entre el porcentaje graso corporal y la **LBP**. Esto se puede interpretar como reflejo de la presencia de síndrome metabólico, que produce un estado proinflamatorio secundario que promueve la síntesis de esta proteína a nivel hepático. También se ha descrito que dietas ricas en grasa pueden modificar la microbiota intestinal y con ello aumentar la traslocación bacteriana (215). Sin embargo, la **IL6** no mostraba relaciones significativas con la grasa corporal. Sí se detectó una correlación directa con el IMC. Ya se había descrito una relación entre IL6 e IMC en un estudio sobre los diferentes haplotipos de IL6, si bien en nuestro estudio, no contemplamos esta variable (286). Además, la IL6 se relacionaba de forma negativa con

la cantidad de agua intracelular. Pese a no encontrar datos que expliquen esta relación, sí sabemos que la IL6 es una citocina que se eleva precozmente en procesos infecciosos, inflamatorios e incluso durante el ayuno. En lo que se refiere al **estadio de fibrosis** de la enfermedad, el **genotipo IL28B**, la **EH** y el **genotipo PNPLA3**, no se encontraron relaciones significativas relevantes.

Respecto a la **RI**, se detectó que los pacientes que presentaban un HOMA>3 tenían mayor IMC, mayor porcentaje graso y menor cantidad de agua corporal extracelular y total. Al mismo tiempo, se obtuvo una correlación inversa entre los dos último parámetros y el HOMA. Pese que esta técnica tiene sus limitaciones y no permite establecer diferencias entre los diferentes componentes grasos corporales (subcutáneo *versus* visceral) está establecido que una mayor acumulación de grasa, así como un mayor IMC se relacionan con la presencia de RI.

### **1.2.- Parámetros bioquímicos nutricionales:**

Se dispone de datos de los niveles de albúmina, colesterol y prealbúmina en los 79 pacientes incluidos.

Los tres parámetros seleccionados se relacionaban de forma inversa con los valores de **IL6**. Esto sería explicable por la estimulación de la síntesis de IL6 en la desnutrición que ya hemos señalado previamente. No existían relaciones significativas de estas variables con la **LBP**.

Como era esperable, en **estadios** más avanzados de fibrosis se detectaron menores cifras de albúmina, colesterol y prealbúmina, esta última sin llegar a la significación estadística. Tal como se señaló en la introducción, estas sustancias son de síntesis mayoritariamente hepática, por lo que una HCC avanzada asociada a la disfunción del órgano, da lugar a valores disminuidos de las mismas.

No se encontraron diferencias significativas de estos parámetros para los diferentes **genotipos de IL28B**. Basados en el estudio de Li *et al.*(48), realizamos un subestudio que demostró valores más altos de colesterol HDL en pacientes con genotipo desfavorable (portadores del alelo T), aunque no encontramos diferencias respecto a los valores de triglicéridos que es lo que estaba previamente descrito.

Respecto a la EH, el **genotipo PNPLA3** y la RI, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

### 1.3.- Oligoelementos:

#### Selenio:

En nuestro estudio todos los enfermos tenían concentraciones plasmáticas de selenio dentro de límites normales. En el estudio de correlaciones con otras variables incluidas en el estudio comprobamos únicamente una correlación significativa con las concentraciones de **zinc**, que se explica porque ambos oligoelementos comparten pasos metabólicos y de transporte en el organismo. Esto explica que selenio y zinc compartan una parte importante de sus correlaciones con otros parámetros (véase Tabla 21), entre las que destacan las correlaciones inversas con **IL6, enzimas hepáticas** indicativas de daño necroinflamatorio y algunos **reactantes de fase aguda**.

Posiblemente el hallazgo más interesante de este aspecto de nuestro estudio sea la existencia de un descenso gradual y significativo de las concentraciones de selenio conforme avanza el estadio de **fibrosis hepática**. En este aspecto nuestros resultados coinciden con los de Himoto *et al.* (287) en un grupo de pacientes menor que el nuestro.

No hay, sin embargo, correlaciones con **HOMA y fracciones lipídicas**, lo que sugiere que el selenio no tiene relación con la RI y sus consecuencias, como sí podría tenerlas el zinc. Así pues, no hemos confirmado los resultados comunicados por Himoto *et al.* (287) que establecen una posible relación entre deficiencia de selenio y RI en la hepatitis crónica C. Basan su conclusión en un estudio sobre 52 pacientes en los que existe una correlación en el límite de la significación ( $r = -0,304$ ,  $p = 0,0338$ ) entre concentración sanguínea de selenio y HOMA.

Por su parte, Ko *et al.* (75) detectaron una correlación inversa significativa entre carga viral, expresada en log 10, y selenio en sangre ( $r = -0,742$ ,  $p < 0,001$ ) en un grupo de 33 pacientes. Nuestros resultados no indican relación alguna con este parámetro.

Por lo tanto, nada indica que exista deficiencia significativa de selenio en la infección crónica por VHC y su relevancia en el cuadro bioquímico, nutricional y

evolutivo es poco relevante. No obstante algunos estudios han detectado bajas concentraciones de selenio en enfermos con CHC sobre cirrosis por VHC, tratando de establecer con ello una relación de riesgo que se da también para otros tumores malignos (76,288–290), que requiere confirmación en estudios adecuadamente diseñados.

### Cobre:

Disponemos de determinación de cobre en sangre en 66 casos, ya que en el resto la muestra no se procesó adecuadamente y se desechó por posible contaminación. Tomando como valores de referencia los proporcionados por nuestro laboratorio, no había ningún caso con valores por debajo del intervalo normal y solo 5 enfermos superaban ligeramente el límite superior del mismo. Esto no confirma los resultados de algunos estudios previos (79,80), basados en muestras de menor tamaño y que comunican cifras elevadas de cobre en sangre en enfermos con hepatitis C en comparación con controles normales, pero coincide con los obtenidos en otros estudio más riguroso metodológicamente (81).

Dentro de esta casi total adaptación a la normalidad, hemos detectado en nuestro estudio una correlación directa significativa entre cupremia y LBP en sangre que podría sugerir que el incremento de la permeabilidad intestinal que refleja el aumento de LBP podría haber facilitado una mayor absorción de cobre. A su vez, el aumento de actividad inflamatoria que induce la LBP puede haber inducido una mayor síntesis de ceruloplasmina ( $r= 0,330$ ;  $p=0,007$ ), que es un reactante directo de fase aguda, y que podría explicar las cifras algo más elevadas de cobre.

Otro hallazgo interesante de nuestro estudio es la marcada correlación positiva que hemos detectado entre cupremia y grasa corporal, valorada mediante impedanciometría, que tiene su contrapartida en las correlaciones negativas de grado similar con el resto de los compartimentos corporales (masa muscular, masa magra y agua intra y extracelular). Esto podría ser reflejo de que el tejido adiposo es lugar preferente de depósito de cobre en el organismo a lo largo de la vida (también hemos detectado una correlación directa entre cupremia y edad) aunque no hemos encontrado datos en la bibliografía sobre la distribución del cobre en los diferentes compartimentos del organismo humano.

En lo que se refiere a los objetivos más específicos de este estudio, nuestros resultados no detectan relaciones entre cupremia y grado de lesión hepática (estadio de fibrosis y EH), ni con la resistencia a la insulina.

#### Zinc:

Disponemos de determinación de zinc en sangre en 67 casos, ya que en el resto la muestra no se procesó adecuadamente y se desechó por posible contaminación. De acuerdo con el intervalo de la normalidad proporcionado por nuestro laboratorio (60-150 µg/dl) solo 3 pacientes estaban por debajo del límite inferior de la normalidad y ninguno superaba el límite superior. Sin embargo, el intervalo admitido internacionalmente es algo más estrecho (75-120 µd/dl) y en este supuesto el 34,3 % de nuestros casos estaban por debajo de la normalidad y ninguno por encima. Esta última valoración coincide con la señalada en la bibliografía (78–80).

En todo caso, existe una clara relación entre la concentración de zinc en sangre y los marcadores de actividad inflamatoria que indica que el zinc en sangre disminuye cuando se incrementa la actividad inflamatoria, reflejada en valores más altos de IL6, fibrinógeno y enzimas hepáticas y más bajos de prealbúmina y RBP, que son reactantes inversos de fase aguda (su síntesis disminuye si hay inflamación).

Por otra parte, hemos detectado un descenso de la concentración de zinc en sangre conforme va progresando el estadio de fibrosis, como ya se había puesto de manifiesto anteriormente en ésta y otras hepatopatías crónicas.

Lo más relevante para los objetivos principales de este estudio es nuestra constatación de la relación de concentraciones más bajas de zinc con el estado de resistencia a la insulina, valorado con el índice HOMA. Existe además una relación directa entre el zinc y el colesterol total y LDL en la sangre. Ambos hallazgos sugieren que una deficiencia relativa de zinc puede ser una consecuencia del síndrome metabólico o, lo que sería más interesante, ser un factor inductor de RI (87). En un artículo muy reciente de este mismo grupo (291) se comunica la existencia de una correlación inversa entre zinc y ferritina en sangre, lo que los autores interpretan como prueba de sobrecarga hepática de hierro que a su vez, a través de un incremento del estrés oxidativo, sería responsable de la RI. Esta explicación es muy cuestionable; por un

lado nosotros no hemos detectado ninguna de estas correlaciones siendo mayor el tamaño de nuestra serie (correlación ferritina-zinc:  $\rho = -0,031$ ,  $p = 0,805$ ). y en segundo lugar la hiperferritinemia en la hepatitis crónica C y en el síndrome de RI obedece casi siempre a que la ferritina es un reactante de fase aguda y no a sobrecarga férrica, como hemos comprobado directa e indirectamente en anteriores estudios de nuestro grupo (181,292,293).

#### **1.4.- Vitamina A, RBP4 y cociente vitamina A/RBP4:**

Existe una estrecha correlación entre las concentraciones de vitamina A y RBP4 en suero, lo cual es lógico si se tiene en cuenta que la RPB4 transporta el 95 % del retinol sérico, formando complejos retinol-RBP4 unidos a transtiretina, que los dota de estabilidad reduciendo la filtración renal de RPB4 (90,294). Si se utiliza la concentración de vitamina A como criterio de deficiencia lo que se está valorando realmente es la concentración de RBP4. Esto explica el estrecho paralelismo en los resultados que establecen la relación de ambas variables con los parámetros que se asocian a hepatopatía avanzada: tendencia a trombopenia, alargamiento del tiempo de protrombina, hipoalbuminemia, hipocolesterolemia, disminución de zinc e incremento de enzimas hepáticas y de bilirrubinemia.

Hay argumentos para considerar que la concentración baja de vitamina A, aunque sea un reflejo fiel de la disminución de RBP4 y no necesariamente de depleción de los depósitos hepáticos de retinol, origina una deficiencia de vitamina A en los tejidos, que la obtienen a partir del complejo Vit.A-RBP4-transtiretina circulante y no de los depósitos hepáticos.

Los tres estudios sobre concentración de **vitamina A** en enfermos con hepatitis C que hemos identificado en la literatura coinciden en utilizar la concentración sérica de la vitamina como criterio de deficiencia. Los tres coinciden en señalar que la concentración en suero de vitamina A es tanto más baja cuanto más avanzado es el estadio de fibrosis(74,94,97). Estos resultados coinciden con los encontrados por nosotros, con la salvedad de que en nuestro estudio no hay diferencias en las

concentraciones de vitamina A entre los estadios 0 y 3, produciéndose el descenso significativo en los enfermos en estadio cirrótico (F4) (Figura 8).

El hallazgo de una relación entre cifras más elevadas de vitamina A y la posesión del alelo T del genotipo IL28B no había sido señalado con anterioridad. Existe una clara relación dosis-gen, ya que los homocigotos CC tienen cifras más bajas que los CT y éstos que los TT. La posesión del alelo T se asocia con una menor probabilidad de respuesta al tratamiento combinado con Peg-IFN y ribavirina (45) y con un nivel basal más elevado de expresión de genes estimulados por IFN (46).

La interpretación de estos resultados se ve muy dificultada por el hecho ya comentado de que la vitamina A en suero es un reflejo casi absoluto de la de RBP4, y esta proteína está muy influida por la propia infección viral. Los estudios publicados al respecto detectan que la **RBP4 plasmática** está inversamente correlacionada con el estadio de fibrosis (295,296) y con el grado necroinflamatorio (296,297) y además la respuesta viral sostenida al tratamiento con interferón se sigue de un incremento significativo de la concentración de RBP4 que refleja la mejoría de la función hepática (298). Por otra parte, se ha comprobado que el hígado de los enfermos con hepatitis C acumula RBP4, fenómeno que no se detecta en sujetos sanos, y que este depósito es mayor en sujetos con fibrosis significativa o avanzada ( $\geq F2$ ); esta aparente paradoja podría explicarse si el virus C incrementara la expresión de RBP4 en el hígado y al mismo tiempo dificultara la exportación del complejo RBP4-vitamina A al plasma (98).

Por el contrario, si se utiliza el **cociente molar vit. A/RBP4** lo que se está midiendo realmente es qué proporción de la capacidad total de unión de la Vit.A con la RBP4 existente es realmente utilizada por la vitamina para su transporte a los tejidos. Cuanto más bajo sea este cociente, menos vitamina A hay disponible para su unión a la proteína y por lo tanto es un índice fiable de los depósitos de vitamina A en el hígado, que es donde se acumula el retinol y se sintetiza la RBP4, formándose el complejo que pasa a la sangre para transportar la vitamina A los tejidos. Nosotros hemos utilizado en nuestro estudio un valor de corte de 0,8, basándonos en datos obtenidos hace años en controles normales de raza blanca y nacionalidad española (299).

Si se usa el cociente Vitamina A/RBP4  $< 0,8$  como criterio de deficiencia de vitamina A, el 66,2 % de nuestros enfermos tienen algún grado de deficiencia. Del



conjunto de parámetros biométricos y analíticos estudiados, el único que muestra relación significativa (inversa) con el cociente es el HOMA, lo que avala el concepto de que es la deficiencia de vitamina A *per se*, y no el efecto de una hipotética sobreexpresión de RBP4, la que incrementa el riesgo de desarrollar resistencia a la insulina.

Los criterios basados en la concentración de vitamina A y en el cociente Vitamina A/RBP4 no son plenamente coincidentes. En nuestro estudio, el 84 % de los enfermos con vitamina A < 0,30 mg/L tenían cociente Vitamina A/RBP < 0,8 pero el 68,6 % de los enfermos con cociente Vitamina A/RBP < 0,8 tenían valores de vitamina A  $\geq$  0,3 mg/L. Solamente 16 pacientes cumplían ambos criterios de deficiencia y 23 presentaban valores normales de ambos parámetros. Por lo tanto la mitad de nuestros casos tienen una conducta contradictoria frente a ambos criterios.

La presencia de manifestaciones clínicas asociadas con deficiencia de vitamina A en la HCC solo ha sido evaluada por un grupo (89) que señala que el 18 % de los enfermos estudiados presentaban ceguera nocturna, pero estos autores no muestran datos que relacionen los niveles bajos de vitamina A con esta manifestación clínica. Por lo tanto los criterios clínicos carecen de sensibilidad para establecer si una cifra baja de vitamina A se debe a verdadera deficiencia o a insuficiente producción de RBP4. Para obviar este inconveniente se ha descrito una prueba de respuesta rápida a una dosis única de vitamina A que se administra por vía intravenosa. Si a las 5 horas se produce un incremento > 20 % en la concentración plasmática de retinol, es que la apoproteína RBP acumulada en el hígado se une a la vitamina A inyectada y pasa al suero y por lo tanto existe una verdadera deficiencia de la vitamina; si no ocurriera esto la causa sería la ausencia de Apo-RBP en el hígado. Este test se ha simplificado para su aplicación en la clínica y podría resolver esta discordancia (300).

### **1.5.- Análisis de vitamina D:**

Los resultados de este estudio coinciden plenamente con los comunicados anteriormente por nuestro grupo en una serie más amplia (115), en el sentido de que la deficiencia o insuficiencia de vitamina D es muy frecuente en la hepatitis crónica por VHC. Solo el 26,6 % de nuestros enfermos presentaban valores de 25-OH-vitamina D en suero mayores de 30 ng/ml, que se considera el límite inferior de la normalidad. Hay

que señalar que la recogida de casos se realizó entre septiembre de 2013 y mayo de 2014 y por lo tanto incluyó otoño, invierno y primeras semanas de la primavera, fechas en que la exposición a la luz solar es menor.

La concentración plasmática de 25-OH-vitamina D no guarda relación con ninguna de las variables categóricas incluidas en este estudio, incluyendo el sexo, los polimorfismos IL28B y PNPLA3, el estadio de fibrosis y la resistencia a la insulina definida por el índice HOMA. En el análisis de correlaciones con las variables continuas incluidas en el estudio se detectan correlaciones directas significativas con creatinina, T3L, prealbúmina, vitamina A y RBP. En los tres últimos casos la significación es relativamente baja ( $0,01 > p < 0,05$ ) y podría justificarse porque las vitaminas A y D son ambas liposolubles y su biodisponibilidad está modulada en parte por factores comunes.

### 1.6.- Análisis de los fenotipos de DBP:

En este estudio sólo disponemos de resultados de biopsia hepática en 25 pacientes, por lo que no es posible analizar de forma directa la posible relación entre el grado necroinflamatorio inducido por la infección crónica por el VHC y el polimorfismo Gc.

Es bien sabido que la vitamina D juega un papel inmunomodulador intrínseco. Es tentador pensar que el polimorfismo del gen Gc, al influir sobre la concentración plasmática de la proteína transportadora en sus diversas isoformas y por lo tanto en las concentraciones totales de vitamina D en plasma, puede modular esta función a través simplemente de una mayor o menor disponibilidad de vitamina D. Ya hemos visto, sin embargo, que las diferentes isoformas de la proteína transportadora exhiben diferentes grados de afinidad por la vitamina D y que la fracción libre de ésta, que es la fisiológicamente activa, no depende del polimorfismo del gen Gc(139).

En este estudio hemos detectado que los portadores del genotipo rs7041GG – y por tanto del fenotipo Gc1S/Gc1S – expresan determinados **marcadores inflamatorios** de forma más marcada que los portadores del alelo rs7041T, tanto en homo como en heterocigosis. Esto es especialmente significativo para un reactante de fase aguda como la ferritina plasmática. Un marcador indirectamente relacionado con la inflamación crónica de bajo grado y con el síndrome metabólico, como el ácido úrico, también se ve

influido significativamente por este polimorfismo. Sin embargo, no se detectaron diferencias en los valores de LBP e IL6.

Las diferencias significativas que hemos detectado en los valores de sideremia, TSH y creatinina, todos ellos más altos en el grupo con fenotipo Gc1S/Gc1S, no tienen una justificación clara. Dado que no hay diferencias significativas en las concentraciones de 25-OH-vitamina D entre los fenotipos DBP, esta posible relación no parece depender de la **vitamina D**, sino del polimorfismo Gc propiamente dicho.

El **estadio de fibrosis** se estableció mediante el estudio histológico en los pacientes que se disponía del mismo, y mediante elastografía transitoria (Fibroscán®) en los demás. No hemos detectado diferencias entre la distribución de esta variable y los diferentes fenotipos DBP, ni tampoco en el análisis pormenorizado por cada uno de los dos SNPs que conforman estos fenotipos. Estos resultados coinciden con los de Petta *et al.* (301) que tampoco detectaron relación significativa del polimorfismo rs7041 con el estadio de fibrosis en 260 pacientes con hepatitis crónica por VHC genotipo 1.

La **esteatosis** fue valorada histológicamente en los pacientes biopsiados y mediante estudio ecográfico en el resto de los casos. En un trabajo previo de nuestro grupo (181) en el que disponíamos de ecografía y biopsia en un grupo amplio de pacientes remitidos para estudio de hipertransaminasemia de origen no filiado, observamos que la ecografía es muy específica para la detección de EH, pero no demasiado sensible. Es decir, que cuando el estudio ultrasonográfico detecta un patrón compatible con EH es altamente probable que ésta sea evidente en la biopsia, aunque hay casos con EH en la biopsia que tienen ecografía normal. En este estudio tenemos evidencia histológica y/o ecográfica de EH en 16 pacientes, ausente en el resto. No existen diferencias en la distribución de los SNP GC ni de los fenotipos DBP en función de la presencia o no de EH. No hemos encontrado en la bibliografía datos con los que comparar nuestros resultados.

El principal hallazgo de nuestro estudio en este aspecto concreto ha sido que en el grupo de sujetos 7041GG/4588CC (y por tanto Gc1S/Gc1S) los valores de **insulinemia** y de **HOMA** son significativamente más elevados que en el resto de los casos considerados en conjunto y de forma individual (Tabla 33). Esto indica que este haplotipo se asocia con menor sensibilidad a la insulina que el resto de las

combinaciones. Por lo tanto es la posesión del genotipo rs7041GG la que por sí sola determina estas diferencias, ya que el resto de los haplotipos, independientemente de que incluyan el alelo rs7041G en heterocigosis o no, muestran cifras uniformemente más bajas de HOMA e insulinemia.

En 1987 un estudio pionero de Szathmary (302) en una tribu aborigen del norte de Canadá puso de manifiesto que los portadores homocigotos de la isoforma Gc1F tenían niveles menores de insulinemia que el resto de las combinaciones. Este fenotipo es excepcional en nuestro estudio (solo lo hemos detectado en un caso). Posteriormente Hirai *et al.* (303,304) comprobaron esta observación en sujetos japoneses. Dado que esta isoforma es la alternativa a la Gc1S, estos resultados confirman indirectamente los nuestros. El resto de los estudios publicados son contradictorios e incluyen pacientes ya diagnosticados de diabetes (criterio de exclusión en el nuestro) (305–310).

Nuestro estudio pone de manifiesto que los sujetos con hepatitis C portadores del fenotipo Gc1S/Gc1S presentan un **índice de masa corporal** significativamente más alto que el resto de los fenotipos considerados en conjunto pero no a expensas de una mayor proporción de grasa corporal, como cabría suponer, sino de una mayor proporción de **masa magra** acompañada de una cantidad más baja de **agua extracelular**. De hecho, aunque las diferencias no alcanzan significación estadística debido a la dispersión de los resultados, se aprecia un incremento de músculo y una disminución de grasa en los sujetos con el fenotipo citado que están en el mismo rango que los resultados significativos.

La posible explicación de este hallazgo es especulativa. Por un lado, es sabido que la insulina es una hormona anabólica que aumenta la síntesis y reduce la degradación de proteínas en muchos tejidos, especialmente en el músculo, y dado que en la RI (y en los sujetos Gc1S/Gc1S de nuestro estudio) la insulinemia está significativamente aumentada, cabría suponer que también lo está su efecto anabólico sobre el músculo (211,311).

Sin embargo, la RI que está en el origen del síndrome metabólico se caracteriza precisamente por una sensibilidad reducida del músculo a la acción de la insulina, al menos en lo que se refiere a la captación y utilización de glucosa (211) por lo que la hiperinsulinemia no tendría que traducirse necesariamente en un incremento del

anabolismo proteico que diera lugar a un incremento de la masa muscular, salvo que ambas funciones de la insulina a nivel muscular fueran independientes y divergieran en su grado de deterioro.

Así pues nuestro hallazgo abre una vía a futuras investigaciones pero en este momento no podemos explicarlo de manera plenamente concluyente.

## **2.- ESTADO INFLAMATORIO SISTÉMICO EN LA HCC:**

### **2.1.- LBP e IL6:**

El 27 % de los enfermos incluidos en el estudio tienen valores de **LBP** en suero por encima del límite superior de la normalidad. Este aumento es independiente del estadio de fibrosis, lo que sugiere que en la infección crónica por VHC la traslocación bacteriana se produce ya desde los primeros estadios de la enfermedad, sin que por tanto exista hipertensión portal significativa.

De los parámetros que se correlacionan de forma estadísticamente significativa de entre los incluidos en este estudio con la concentración de LBP en suero destacamos IL6, fibrinógeno, cociente vitamina A/RBP y presencia de EH.

La relación con IL6 es lógica ya que el LPS que transporta la LBP es el estímulo principal para la producción de esta citocina por las células de Kupffer, como ya se ha señalado en la introducción. La relación con el fibrinógeno puede justificarse por ser esta proteína un reactante de fase aguda que aumenta en estados inflamatorios.

La relación con el cociente vitamina A/RBP es inversa, pero en realidad debe considerarse como directa, ya que este cociente valora la deficiencia genuina de vitamina A y es tanto más alto cuanto mayor es el contenido de retinol en las células hepáticas, como se explica en otra parte de esta discusión (véase subcapítulo dedicado a la vitamina A). Por lo tanto, a mayor LBP, menor absorción intestinal y menor contenido hepático de vitamina A. Esto sugiere que la alteración de la permeabilidad intestinal inducida por el LPS altera directamente la absorción intestinal de vitamina A. Una explicación complementaria, que no excluyente, es que la activación de las células estrelladas desencadenada por el LPS (167) reduzca el contenido de vitamina A en estas

células que en condiciones normales almacenan el 90 % de las reservas de retinol del organismo.

La concentración de LBP en plasma es significativamente mayor en los sujetos con esteatosis hepática que en el resto. Este hallazgo debe ser valorado con cautela, puesto que el método utilizado para establecer la presencia de EH en nuestro estudio ha sido la ecografía en la mayor parte de los casos y la biopsia sólo en una minoría, y según datos previos de nuestro grupo (181) la ecografía es muy específica pero adolece de sensibilidad para detectar EH. No obstante, cabe interpretarlo como indicativo de que la EH es un reflejo de síndrome metabólico y por lo tanto de una situación inflamatoria sistémica de bajo grado que puede repercutir sobre la mucosa intestinal e incrementar la traslocación bacteriana y con ello la LBP, y en este caso la EH sería causa, y no consecuencia, del aumento de la traslocación. De hecho, en el hígado graso no alcohólico que suele asociarse con RI existe aumento de endotoxina bacteriana circulante (166). Esta explicación puede verse reforzada por la correlación detectada entre HOMA y LBP, pero la significación hallada en el análisis univariado está en el límite ( $p = 0,03$ ) y será en el subcapítulo 4 de esta discusión cuando sea objeto de análisis multivariado.

En la revisión de la literatura que hemos realizado solo hemos encontrado un artículo que comunique datos de LBP plasmática en enfermedades hepáticas crónicas sin especificar la etiología y de muy escasa relevancia, que señala que los valores de LBP son más elevados en los pacientes con hepatitis crónicas y con cirrosis en relación con controles normales (168).

Hay otros dos estudios que analizan los valores de LPS, determinado mediante el test del límulo, de cuya fiabilidad dudan incluso los propios autores. El primero de ellos (312) detecta niveles significativamente elevados de endotoxina en 30 pacientes con infección crónica por VHC al compararlos con 18 controles sanos. El segundo estudio es el ya mencionado de Sandler *et al.* (167) que incluye 84 pacientes con hepatitis crónica vírica (63 de ellos por VHC) con biopsia hepática y clasificados en fibrosis avanzada (estadio 5-6 de Ishak, 68 casos) o mínima (estadio 0-1 de Ishak, 16 casos) y los compara con 67 controles sanos, detectando valores significativamente más elevados de LPS en

los enfermos con hepatitis, aunque sin diferencia significativa entre los dos grupos extremos de fibrosis.

En conclusión, la LBP circulante está aumentada en una proporción significativa de sujetos con infección crónica por VHC y guarda relación con marcadores de inflamación (IL6 y fibrinógeno), con el riesgo de presentar EH y con deficiencia absoluta (malabsortiva o intrahepática) de vitamina A.

Los resultados de nuestro estudio sugieren que la **IL6** en suero es un índice del grado de daño hepático, como sugiere su relación directa con AST, fosfatasa alcalina y bilirrubinemia y sobre todo con el estadio de fibrosis avanzada.

A su vez, nuestro estudio pone de manifiesto que la IL6 se relaciona con el deterioro del estado nutricional puesto de manifiesto por la relación inversa con la albuminemia y el colesterol LDL (que refleja la síntesis de lipoproteínas hepáticas). La correlación negativa con los niveles de selenio y de zinc debe interpretarse en el mismo sentido.

Por la relación inversa con los niveles de RBP y prealbúmina, que son reactantes negativos de fase aguda, se ha observado que la IL6 es un indicador de inflamación crónica de bajo grado. Los bajos niveles de vitamina A no reflejan deficiencia absoluta de esta vitamina, sino de su proteína transportadora, la RBP, aunque sí pueden sugerir deficiencia funcional, al no haber vitamina A circulante suficiente para subvenir a las necesidades de los tejidos del organismo.

Es universalmente aceptado que la IL6 es una citocina proinflamatoria potente, ubicua y de aparición precoz que colabora en el desencadenamiento de la respuesta de fase aguda (313). Aunque su determinación forma parte de la batería analítica desplegada en diversos estudios en relación con la inflamación, el daño hepático y la RI en la infección crónica por VHC, los resultados no son demasiado concluyentes. En este estudio hemos detectado valores elevados de IL6 tan solo en el 15 % de nuestros enfermos, con predominio en enfermos cirróticos. En el estudio de Jonsson *et al.* (175) se detectan valores elevados de IL6 en enfermos con hepatitis C frente a controles sanos, sin que existan diferencias entre los enfermos con fibrosis leve (F0-F1) y avanzada (F5-F6). Hallazgos similares a los comunicados por Spanakis *et al.* (171), Grüngeiff *et al.*

(81), Hung *et al.* (314) y Sandler *et al.* (167) sobre series más cortas de pacientes. En el estudio de López-Prieto *et al.* (315) se incluyeron pacientes coinfectados por VIH o con antecedentes de consumo excesivo de alcohol, lo que resta especificidad a sus resultados, que de todos modos coinciden con los anteriormente citados.

### 3.- ESTEATOSIS HEPÁTICA EN LA HCC:

#### 3.1.- **Esteatosis hepática y polimorfismo *PNPLA3*:**

Hemos agrupado estos aspectos de nuestro estudio por estar, *a priori*, estrechamente relacionados. La **esteatosis hepática** estaba presente en 16 casos, aunque no puede descartarse su presencia en alguno de los enfermos sin datos de biopsia hepática y ecografía normal. Salvo la relación entre esteatosis y resistencia a la insulina, aspecto que será comentado en el apartado dedicado a esta última, no hemos hallado correlaciones significativas de este trastorno con ninguno de los parámetros nutricionales, bioquímicos, virológicos e inflamatorios incluidos en este estudio, salvo con concentraciones más elevadas de GGT.

En lo que respecta al **polimorfismo *PNPLA3***, nuestros resultados son esencialmente negativos, ya que no hemos hallado relación con la RI ni con la presencia de grasa en el hígado, que era el objetivo principal de este subestudio. Estos resultados se oponen a la mayoría de los comunicados en la bibliografía (201,203,204), todos ellos en poblaciones mediterráneas de raza blanca, que sí confirman una clara relación de riesgo entre esteatosis y alelo *PNPLA3* G, pero coinciden con los comunicados por Nakamura *et al.* (316) que no detectan dicha relación, utilizando criterios ecográficos para la identificación de EH, en un grupo de 260 enfermos infectados por VHC.

Hemos comprobado la existencia una relación de riesgo entre la posesión del alelo G de este polimorfismo y grados más avanzados de fibrosis hepática, especialmente si se considera la relación con la cirrosis (Odds ratio 4,45, 95 % I.C. 1,41-14,10) a pesar del relativamente pequeño tamaño muestral. Este hallazgo es confirmatorio de los comunicados en un estudio previo (201) cuyo mayor tamaño muestral permite a sus autores concluir que existe una relación dosis-gen, ya que la fibrosis avanzada era más frecuente en los portadores homocigotos GG que en



heterocigotos CG. Estos resultados coinciden con los comunicados en 575 pacientes suizos por Rüeger *et al.* (317) aunque en este caso la importancia de este factor es relativamente pequeña en relación con otros factores estudiados (fracción atribuible de riesgo 7,6 %). En nuestro país, Ampuero *et al.* (204) en su estudio sobre 474 pacientes no detectaron relación entre el estadio de fibrosis y el polimorfismo *PNPLA3* aunque centran su análisis en la relación con la esteatosis haciendo escasa mención a otros aspectos histológicos de la hepatopatía por VHC.

#### **4.- RESISTENCIA A LA INSULINA EN LA HCC:**

Los resultados de nuestro estudio confirman plenamente que la RI es muy frecuente en la infección crónica por VHC. Hemos usado como criterio de identificación del trastorno la posesión de un índice HOMA > 3, que indudablemente es arbitrario pero es el más utilizado en clínica. Romero *et al.* (253) utilizaron un punto de corte más bajo, con el cual el 81 % de nuestros pacientes habrían sido diagnosticados de RI. A efectos clínicos y no epidemiológicos, se considera que este límite tan bajo sobreestima la incidencia real del trastorno y se recomienda usar un punto de corte en el rango del seleccionado por nosotros (318).

La RI en la infección crónica por VHC comparte con la presente en el síndrome metabólico una serie de factores de riesgo o de marcadores asociados a su presencia. Es difícil precisar qué alteraciones son causa y cuáles consecuencia del trastorno fundamental del síndrome metabólico, pero parece claro que la RI es la respuesta original al estado inflamatorio crónico de bajo grado que se asocia indisolublemente a este síndrome. En el caso de la hepatitis C hay que considerar que ese componente inflamatorio que le es propio se añade a los factores que participan en el síndrome metabólico en general y que pueden estar presentes en un enfermo con hepatitis C.

El análisis de regresión logística ha permitido identificar las variables relacionadas independientemente con la RI que merecen un comentario pormenorizado a la luz de los conocimientos fisiopatológicos actuales. Antes de desarrollarlo es necesario señalar que el tamaño muestral de nuestro estudio es relativamente pequeño, lo que se explica por la gran complejidad del protocolo experimental, que ha incluido variables muy diversas: bioquímicas, virológicas, biométricas, genéticas, histológicas y

análisis especiales. Por ello, nuestras conclusiones, cuando las exponamos, deben considerarse como indicativas de un trabajo a desarrollar con mayor especificidad de objetivos y mayor tamaño muestral. Este estudio ha identificado nuevas líneas de investigación que mantendremos abiertas en los próximos años.

El **sexo masculino** es el primer factor de riesgo seleccionado en el análisis de regresión. Es un hecho bien conocido que guarda relación con la mayor proporción de grasa visceral abdominal en los hombres, aunque su importancia va declinando conforme aumentan la edad y el IMC de la población estudiada (319).

Lo mismo que el sexo, la **edad** no mostraba diferencias estadísticamente significativas entre los grupos sin y con resistencia a la insulina, pero la hemos incluido en el análisis puesto que entre las circunstancias que determinan la aparición de este trastorno figura el envejecimiento (320). Hemos comprobado que existe una relación muy significativa entre edad y presencia de resistencia a la insulina ( $p = 0,001$ )

El hallazgo de que los sujetos sin resistencia a la insulina tienen una mayor cantidad de **agua extracelular**, que se expresa en términos absolutos (litros) y no en porcentajes es de explicación más compleja. Una posible explicación sería que el peso corporal medio fuera menor en el grupo con resistencia a la insulina, pero ocurre exactamente todo lo contrario ( $73,5 \text{ kg} \pm 11,4$  vs  $67,8 \pm 11,7$ ,  $p = 0,037$ ), aunque en el análisis separado por sexos la diferencia es mayor en las mujeres ( $71,9 \pm 12,6$  vs.  $62,7 \pm 11,2$ ,  $p = 0,023$ ) y pierde significación en los varones ( $75,0 \pm 10,4$  vs.  $74,3 \pm 8,9$ ,  $p = 0,836$ ). La segunda explicación es que este exceso de agua extracelular sea consecuencia de una desproporción entre los demás compartimentos. En efecto, los sujetos sin resistencia a la insulina tienen menos grasa corporal y el tejido adiposo tiene menos espacio extracelular y menos agua en el mismo que el tejido muscular; al mismo tiempo, los sujetos con resistencia a la insulina tienen menos masa muscular, y el tejido muscular tiene más espacio extracelular y éste es probablemente más rico en agua. Por lo tanto, si los individuos sin resistencia a la insulina tienen menos grasa y más músculo, es lógico que tengan más agua extracelular, que al compendiar la suma de varias subfracciones sí alcanzaría significación estadística. Más aún, si se elimina del análisis multivariado el dato del agua extracelular, el exceso de grasa corporal en sujetos con resistencia a la insulina alcanza una marcada significación estadística ( $p < 0,001$ ) sin variaciones

relevantes en el resto de componentes del modelo predictivo. Como la impedanciometría no permite diferenciar grasa visceral de grasa subcutánea, ni dentro de la primera la omental de la retroperitoneal, ni el tipo de tejido adiposo, este dato solo permite afirmar que la tendencia a la acumulación de grasa corporal, llegue o no a rebasar los límites del sobrepeso, es un factor de riesgo para el desarrollo de RI. No disponemos de medición del diámetro de la cintura, que hubiera servido para identificar mejor la obesidad visceral. Por lo tanto podríamos concluir, por datos indirectos, que la grasa corporal total es un factor relacionado con la RI en la infección crónica por VHC, pero no qué compartimento es el directamente asociado con el riesgo de desarrollarla.

La **esteatosis hepática** es el siguiente factor que merece comentario. Ya se ha señalado que la valoración de la grasa hepática en nuestro estudio no es óptima por la insuficiente sensibilidad de la ecografía para valorarla, pero la diferencia es tan marcada que resulta ser altamente significativa. Es lógico que sea así porque la EH no alcohólica es el componente hepático del síndrome metabólico y porque el trastorno del metabolismo lipídico en la hepatitis crónica C es de origen metabólico y no vírico, con la excepción de los casos producidos por el genotipo viral 3. Solo 6 de nuestros pacientes estaban infectados por este genotipo y cuando se les excluye del análisis de regresión logística los resultados apenas se modifican salvo por la entrada del estadio de fibrosis (considerado como variable dicotómica, F0-F1 vs. F2-F4) que en el conjunto de la serie no alcanza la significación y excluyendo los pacientes con genotipo 3 si lo hace ( $p = 0,003$ ).

En este mismo sentido debemos considerar la concentración más elevada de **triglicéridos** en el grupo con resistencia a la insulina, puesto que uno de los componentes del síndrome metabólico es la hipertrigliceridemia por aumento de la síntesis hepática.

La **IL6**, como marcador del estado inflamatorio subyacente y que también interviene directamente en la génesis de la RI, es el siguiente factor involucrado. Existe un acuerdo prácticamente total en la bibliografía sobre su relación con la RI, haya o no infección crónica por el VHC (175,176,249).

El **cociente Vitamina A/RBP4** es significativamente más bajo en el grupo con resistencia a la insulina y, de acuerdo con el razonamiento expresado en el subcapítulo

correspondiente a la vitamina A, lo consideramos como criterio de deficiencia absoluta de vitamina A. La bibliografía disponible sobre este asunto en la hepatitis C es escasa y basada en la concentración sérica de retinol y no en este cociente Vit A/RBP4, sobre cuya situación en la hepatitis C y en otras hepatopatías no hemos encontrado datos; por lo tanto, nuestro hallazgo y su interpretación quedan abiertos al contraste con los resultados de futuros estudios.

Una explicación alternativa es que no exista deficiencia de vitamina A, sino exceso de producción de RBP4, que se sintetiza en el hígado, donde es la proteína de depósito de retinol, pero y también en el tejido adiposo, donde actúa como una adipocina que favorece la resistencia a la insulina al inhibir la expresión del transportador de glucosa 4 (GLUT4). La relación entre sobreexpresión de RBP4 y resistencia a la insulina o sus diversas consecuencias metabólicas es bien conocida (99-103) y objeto de diversas revisiones (101,321). En nuestro estudio, sin embargo, en el que la DM2 fue criterio de exclusión, no existe correlación alguna entre resistencia a la insulina, considerada como variable dicotómica, ni entre insulinemia y HOMA, considerados como variables continuas, y la concentración sérica de RBP4. Por lo tanto concluimos que la RBP4 no interviene de forma relevante en el desencadenamiento inicial de la resistencia a la insulina en la infección crónica por VHC. Probablemente en este caso la RBP4 circulante proceda sobre todo de la síntesis hepática y en escasa medida de la de los adipocitos.

Nuestros resultados no confirman que la cistatina C en suero sea un marcador de resistencia a la insulina, como han sugerido estudios realizados en sujetos afectados de síndrome metabólico pero sin infección crónica por VHC (228–231). A pesar de que en el análisis univariado este péptido emergía con fuerza como factor relacionado con la RI, sale fuera del modelo en los primeros pasos del análisis multivariado, lo que indica que probablemente es un marcador subrogado de alguno de los factores que se mantienen hasta el final, aunque no hayamos podido identificar cuál es.

La inclusión de estas siete variables en un modelo predictivo apoya el origen multifactorial de la RI que aparece con frecuencia elevada en la infección crónica por VHC y que incluye aspectos relacionados con el sexo, el envejecimiento, el metabolismo lipídico y su alteración a nivel hepático, el sustrato inflamatorio y la deficiencia de

vitamina A. Este modelo no tiene utilidad clínica, puesto que es mucho más fácil determinar el HOMA que las variables que lo constituyen, pero sí destaca los factores directamente relacionados con el trastorno. Al mismo tiempo, nuestro estudio no confirma hallazgos previos que avalan la relación de factores tales como la cistatina C, el polimorfismo *PNPLA3*, la concentración de RBP4 o la concentración de vitamina D en suero, que se basan en análisis dirigidos a una sola variable y que no tienen en cuenta las interacciones que sí aborda nuestro planteamiento.

## 5.- FIBROSIS HEPÁTICA EN LA HCC:

La fibrosis hepática es el principal criterio pronóstico en los enfermos con infección crónica por VHC, ya que raras veces la enfermedad pone en peligro la vida o deteriora notablemente la calidad de la misma antes de que se alcance el estadio de cirrosis (F4 en la escala METAVIR), a no ser que concurren manifestaciones extrahepáticas de la enfermedad, como la crioglobulinemia clínicamente manifiesta o un linfoma no Hodgkin de células B, que son poco habituales, especialmente el linfoma.

Además, el estadio de fibrosis ha sido desde hace muchos años el criterio fundamental para establecer la indicación terapéutica. Cuando el tratamiento se basaba en interferón y ribavirina, para demorarlo en los enfermos con fibrosis leve-moderada ( $F \leq 2$ ), con el fin de evitarles los efectos adversos del tratamiento en espera de mejores opciones. Ahora que disponemos de combinaciones de antivirales de acción directa con tasas de RVS próximas al 100 %, su elevado precio ha obligado a priorizar su aplicación a los enfermos en estadios más avanzados ( $F \geq 3$ ), al menos de momento ya que la situación puede cambiar desde que se ha escrito este párrafo hasta que se defienda esta tesis.

El método de referencia para establecer el estadio de fibrosis es la biopsia hepática, procedimiento invasivo y no exento de riesgos. El Fibroscán la ha sustituido casi por completo en la práctica clínica diaria, pero su capacidad discriminativa entre estadios intermedios de fibrosis no es óptima, y es en esta frontera donde se dirime precisamente el momento de la indicación del tratamiento. Los sistemas de puntuación basados en criterios directos o indirectos de fibrosis, cuyos representantes más

conocidos son el APRI y el Fibrotest, presentan también, y posiblemente en mayor medida, este inconveniente.

En este estudio hemos comprobado que marcadores de riesgo de fibrosis avanzada bien conocidos, como el **sexo masculino, la hipoalbuminemia o cifras elevadas de ALT**, mantienen su valor predictivo. Otros, como las plaquetas, no alcanzan significación estadística, probablemente por el pequeño tamaño muestral. Además hemos confirmado la estrecha relación entre resistencia a la insulina y estadios de fibrosis avanzada y reforzado los datos preliminares de otros estudios indicativos de que la posesión del alelo G del polimorfismo rs738409 del gen *PNPLA3* y la concentración de **cistatina C** en suero guardan una estrecha relación de riesgo con el desarrollo de fibrosis.

La inclusión del **polimorfismo del gen *PNPLA3*** en el protocolo del estudio vino motivada fundamentalmente por los datos que lo identificaban como factor predictor de estadios avanzados de fibrosis en la hepatitis C (206–208) aunque otros estudios mostraban resultados discordantes (209). También consideramos la hipotética relación entre este polimorfismo y la resistencia a la insulina a través de la esteatosis hepática para la que ambos son factores patogénicos (195).

Nuestros resultados confirman la relación de riesgo entre la posesión del alelo rs738049G del gen *PNPLA3* y la presencia de fibrosis avanzada ( $\geq$  F3) en la hepatitis crónica C. Esta relación es independiente de la presencia de resistencia a la insulina ya que no existe relación estadística entre ambos factores y probablemente también de la presencia de esteatosis hepática, si bien en este último aspecto las limitaciones técnicas y muestrales de nuestro estudio no permiten ser taxativo.

Muy recientemente, Huang *et al.* (322) han publicado un estudio que ha incluido 1077 enfermos chinos taiwaneses con hepatitis crónica C biopsiados y sometidos a la determinación del polimorfismo *PNPLA3*. Al contrario que el nuestro, este estudio incluyó enfermos diabéticos pero no valoró la resistencia a la insulina con HOMA u otro test equivalente en los enfermos no diabéticos. En el análisis multivariado identifican como predictores de fibrosis avanzada ( $\geq$  F3) la edad, la diabetes mellitus, una cifra de alfa-feto proteína  $> 20$  ng/ml, un recuento plaquetario bajo y la posesión del alelo rs738049G en homo o heterocigosis, con un claro efecto dosis-gen. Los autores afirman que el efecto desfavorable del alelo G sobre la fibrosis se manifiesta solo en enfermos

diabéticos, algo que contradice nuestros resultados, ya que nosotros no hemos incluido enfermos diabéticos y sí hemos comprobado esta relación de riesgo, en consonancia con estudios previos en poblaciones europeas.

Una vez más se confirma en nuestro estudio que la **resistencia a la insulina**, aún sin diabetes mellitus manifiesta, es un factor independiente que acelera la fibrogénesis en la hepatitis crónica C. La resistencia a la insulina es fácil de identificar y susceptible de mejorar si se adoptan unas sencillas medidas dietéticas y de régimen de vida. En la guía clínica emanada de la Conferencia de Consenso sobre el tratamiento actual de la hepatitis crónica C presentada muy recientemente en el Congreso Anual de la AEEH (26 de febrero de 2015) se recomienda que la resistencia a la insulina sea criterio de priorización para recibir los nuevos antivirales de acción directa.

En un anterior estudio comprobamos que la concentración sérica de **cistatina C** se elevaba progresivamente hasta el estadio F3, lo que la hacía un posible marcador de fibrosis avanzada al poder discriminar entre  $F \leq 2$  y  $F \geq 3$ . Dado que la cistatina C no se modifica entre F3 y F4, no se puede considerar como un marcador de fibrogénesis y posiblemente este comportamiento en estadios intermedios obedezca a otros fenómenos patogénicos, como por ejemplo la actividad necroinflamatoria, y se deba considerar como meramente instrumental aunque desconozcamos por el momento los mecanismos subyacentes. Nuestros resultados confirman que la cistatina C en suero aporta capacidad discriminativa al modelo

Algunos de estos factores son conocidos de antiguo, otros son de reciente identificación. La aportación original de nuestro estudio ha sido su integración en un modelo predictivo de fibrosis que permite establecer con alta sensibilidad y especificidad si un paciente tiene fibrosis avanzada o no. La comparación con el rendimiento del test APRI muestra una marcada superioridad de este nuevo modelo.

Estos resultados deben considerarse preliminares y requieren confirmación por estudios sobre series más amplias, en los que el patrón de referencia sea la biopsia hepática. Lo primero es fácil de conseguir, dada la amplia casuística disponible, pero no lo segundo ya que la oposición a la práctica de una biopsia es creciente entre los pacientes, a quienes se ha hecho creer falsamente que el Fibroscán la sustituye a plena satisfacción. De hecho, el Fibroscán tiene limitaciones intrínsecas de tipo técnico y un

margen no desdeñable de imprecisión y por ello es pertinente seguir investigando marcadores de fibrosis que mejoren el rendimiento de los existentes. En este sentido cabe citar el nuevo “Fibro-check” propuesto por Attallah *et al.* (323) que incluye colágena III, metaloproteinasa de matriz 1 y cociente AST/ALT y que proporciona un AUROC de 0,910 para diferenciar fibrosis 0-2 de fibrosis 3-4, muy similar a nuestra propuesta pero requiriendo determinaciones no habituales en el laboratorio clínico. Tampoco lo es la identificación del polimorfismo del gen *PNPLA3*, pero es un método estandarizado, comercializado como kit, accesible, barato y de aplicación en otros campos de la hepatología, especialmente en el estudio de la enfermedad hepática no alcohólica por depósito de grasa, por lo que su implementación en la práctica habitual no plantea dificultades especiales y puede ser de gran utilidad. La experiencia adquirida con el polimorfismo *IL28B*, que resultó decisivo en los últimos años del vigencia del tratamiento basado en interferón, avala la necesidad de que el laboratorio clínico incluya los estudios genéticos en su cartera de servicios.





## **VII.- CONCLUSIONES**



## VII.- CONCLUSIONES:

### 1. De los objetivos preliminares

- a. Los parámetros nutricionales globales proporcionados por la antropometría por impedancia y la evaluación bioquímica habitual tienden a deteriorarse en estadios avanzados de fibrosis y en presencia de resistencia a la insulina.
- b. Las concentraciones de selenio y cobre se mantienen dentro del intervalo normal en la gran mayoría de los pacientes con hepatitis crónica por VHC.
- c. La concentración sérica de zinc disminuye en presencia de resistencia a la insulina y de fibrosis avanzada.
- d. La deficiencia de vitamina A, valorada mediante el cociente vitamina A/RBP4, es muy frecuente en la hepatitis crónica por VHC y guarda relación con la resistencia a la insulina.
- e. El fenotipo Gc1S/Gc1S, definido por el haplotipo bialélico del gen *Gc*, se asocia con mayor prevalencia de resistencia a la insulina.
- f. La batería de indicadores inflamatorios y reactantes de fase aguda incluido en este estudio manifiestan una relación con estadios más avanzados de fibrosis, con la presencia de esteatosis y con la resistencia a la insulina.
- g. El polimorfismo del gen *PNPLA3* no muestra relación con el riesgo de esteatosis ni con la resistencia a insulina.

### 2. Del objetivo principal

La resistencia a la insulina, valorada mediante el índice HOMA, es muy frecuente en la infección crónica por VHC. La resistencia a la insulina está relacionada con múltiples factores nutricionales, metabólicos, inflamatorios y lesionales y ocupa un lugar central en el curso evolutivo de la infección crónica por VHC. El análisis global de los resultados del estudio lleva a seleccionarla como la variable dependiente de este objetivo y permite construir un modelo predictivo basado en siete variables de fácil obtención que ofrece alta sensibilidad y especificidad para la resistencia a la insulina.

### 3. Del objetivo exploratorio

Este estudio confirma la relación bien conocida de diversos parámetros con la presencia de fibrosis avanzada (sexo masculino, hipoalbuminemia, hipertransaminasemia, resistencia a la insulina) y aporta datos que apoyan hallazgos más recientes en relación con el polimorfismo del gen *PNPLA3* y la concentración de cistatina C. Proponemos para su desarrollo un modelo predictivo de fibrosis avanzada basado en estos criterios, puesto que los resultados preliminares le confieren alta sensibilidad y especificidad.

## **VIII.- APÉNDICES**



## **APÉNDICE 1: Documento de Consentimiento Informado.**

### **Estimado señor, estimada señora:**

Estamos atendiéndole en este Servicio porque está diagnosticado de una infección crónica por el virus de la hepatitis C que le produce una inflamación del hígado (hepatitis). En este momento la enfermedad está activa, porque se ha detectado el virus en su sangre.

Sus médicos le han informado de la situación y del alcance que tiene para su salud, así como de las posibilidades de tratamiento disponibles y de si es conveniente administrar este tratamiento sin demora o se puede esperar controlando periódicamente su situación.

Uno de los factores que influyen sobre la evolución de la hepatitis crónica por virus C es el estado de nutrición del enfermo. La valoración del estado nutricional de una persona se puede realizar con métodos sencillos, casi todos análisis de laboratorio y alguno instrumental.

En la Unidad de Hígado del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Clínico San Carlos hemos diseñado un estudio para valorar el estado nutricional de los enfermos que, como usted, tienen una hepatitis crónica C de la que no han sido tratados nunca o, si lo han sido, no han conseguido la curación de la enfermedad. El investigador principal del estudio es el Dr. José M. Ladero Quesada.

Le pedimos que participe como sujeto de este estudio. Las pruebas a realizar son las que habitualmente se utilizan en el seguimiento de su enfermedad y algunas específicamente relacionadas con este estudio, aunque sus resultados también pueden proporcionar información relevante sobre el estado de su enfermedad. Estas pruebas son de dos tipos.

1. Análisis de sangre. Le extraerán aproximadamente 30 ml de sangre (equivalente a dos cucharadas soperas), un poco más que en una extracción habitual.
2. Estudio de su estado nutricional mediante una prueba denominada impedanciometría. Es un método sencillo y rápido de analizar la composición corporal (porcentaje de grasa) que se hace utilizando un aparato similar a una



báscula de baño y cuya realización no representa molestia ni riesgo alguno para usted. En algunos casos esta prueba puede complementarse con un estudio de su metabolismo denominada calorimetría indirecta, que también es inocua; si su médico considera que es adecuado realizarla en su caso, le explicará en qué consiste y usted decidirá si se somete a ella.

Para su comodidad hemos organizado el estudio de modo que la extracción de sangre, la impedanciometría y la calorimetría si se decide hacerla se realicen en una sola sesión a primera hora de la mañana en que se le cite en un laboratorio específico.

Su participación en este estudio es completamente voluntaria y no supone ventajas para usted, aunque nos permitirá conocer mejor la enfermedad que padece, de lo que pueden beneficiarse en el futuro otros pacientes. No obstante, si en el estudio realizado se identificara alguna deficiencia nutricional susceptible de corrección, podríamos administrarle el tratamiento adecuado. Usted puede retirar este consentimiento cuando quiera, sin dar explicaciones y sin que ello repercuta en la atención que reciba por parte de sus médicos.

Como parte independiente de este estudio se ha planteado la recogida de una muestra de sangre para extraer su ADN. El ADN es la molécula que transporta la información genética. La donación de esta muestra es completamente voluntaria y es objeto de información y de autorización independientes que también le facilitamos en este acto. La sangre para este estudio se extraería coincidiendo con la realizada para el estudio general. Si usted está de acuerdo en participar en el estudio pero no quiere donar su muestra de ADN, puede hacerlo sin cumplimentar este requisito. Si acepta donar su ADN le rogamos que lea la información específica. Esta muestra se utilizará exclusivamente en estudios relacionados con la enfermedad que usted padece y en ningún caso para estudios de genética de poblaciones, identificación de factores genéticos de riesgo para otras enfermedades o cualquier otra investigación cuyos resultados puedan influir en su derecho a que no se conozcan ni se investiguen datos relativos a la constitución genética de usted, su familia o su grupo étnico.

Todos los datos relativos a usted y a su enfermedad se mantendrán bajo la más estricta confidencialidad de acuerdo con la ley española (Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos Personales). Los resultados de este estudio se podrán

comunicar en medios especializados, pero respetando siempre la confidencialidad de sus datos individuales.

Si acepta participar en este estudio, le rogamos firme el consentimiento anexo.

Muchas gracias por su tiempo y colaboración.

**CONSENTIMIENTO INFORMADO ESCRITO**

VALORACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL EN ENFERMOS CON INFECCIÓN CRÓNICA  
POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C Y DE SU RELACIÓN CON EL ESTADIO EVOLUTIVO DE  
LA ENFERMEDAD

Yo.....N<sup>a</sup>

Historia.....

Declaro que:

- 1.- He leído la Hoja de Información que me ha sido entregada.
- 2.- He podido hacer preguntas sobre la cesión de datos epidemiológicos y clínicos y obtención de material biológico.
- 3.- He hablado y he aclarado las dudas con el Dr.....
- 4.- Entiendo que mi participación es voluntaria.
- 5.- Comprendo que puedo solicitar la retirada de mi información epidemiológica y clínica y/o la destrucción de mis muestras, sin tener que ofrecer explicación y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos futuros.

Madrid, \_\_\_\_\_

Fdo. D. \_\_\_\_\_



Hospital Clínico San Carlos

Comunidad de Madrid



## CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO DEL HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS

*Espacio para la etiqueta identificativa  
del paciente*

### Finalidad y descripción del proceso

Este documento tiene como objeto solicitar su autorización para la obtención, si procede, y donación de su muestra (especificar tipo de muestra) ....., al **Biobanco del Hospital Clínico San Carlos**, para que pueda ser conservada y utilizada en investigaciones biomédicas relacionadas con su enfermedad.

Un **Biobanco** es un centro de conservación en condiciones adecuadas de muestras biológicas (tejidos, sangre, ADN...), que representan un valioso instrumento para la investigación de enfermedades y sus tratamientos.

La donación es **voluntaria** y su decisión no afectará a su atención médica.

Si usted da el consentimiento para su uso, en cualquier momento **puede revocarlo** e incluso solicitar la destrucción o la anonimización de la muestra.

### Beneficios esperados y posibles inconvenientes

Su mayor beneficio es el poder ayudar al avance de la medicina en beneficio de la sociedad. No obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma.

Usted puede donar el **sobranante de tejido** obtenido en una intervención quirúrgica, una vez finalizados los procedimientos diagnósticos necesarios para que, en lugar de ser destruido, pueda ser utilizado para investigación. Esto no supone ningún riesgo o molestia adicional. Si va a donar una **muestra de sangre**, la extracción, a veces, le puede ocasionar un pequeño hematoma o una leve inflamación que suelen remitir en pocos días. La obtención de otras muestras como **saliva, orina**,... no supone ningún riesgo adicional.

### Confidencialidad

Los datos personales que se recojan sobre Usted, serán **confidenciales** y procesados de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. Sus datos serán incluidos en un fichero, cuyo responsable es el Biobanco y usted podrá ejercer los **derechos** de acceso, rectificación, cancelación u oposición, poniéndose en contacto con el Biobanco.

La muestra formará parte del Biobanco hasta su uso en un proyecto de investigación pudiendo ser **cedida** a otros investigadores, de acuerdo con la normativa vigente (ley de investigación Biomédica 14/2007 y Real Decreto 1716/2011), para realizar estudios relacionados con su enfermedad. Todo proyecto para el que se usen muestras será previamente aprobado por un **Comité de Ética** acreditado.

El Biobanco tendrá a su disposición la **información** sobre los proyectos en los que se utilice su muestra. En caso de cierre del Biobanco, la información estará disponible en el Registro Nacional de Biobancos.

En el caso que estas investigaciones proporcionen **datos que pudieran ser relevantes** para su salud o la de su familia, tiene derecho a que le sean comunicados, si así lo desea. Si la información es relevante para su familia, le corresponderá a usted decidir si quiere o no comunicárselo.

**Información adicional:**

Puede solicitar información adicional sobre el Biobanco y sus garantías poniéndose en contacto con el **Biobanco** (Servicio de Anatomía Patológica, Baja Norte Tlf 913303031/3032).

También puede consultar con el **Punto de Información para participantes en estudios de investigación** (Unidad de Coordinación de Ensayos Clínicos, 4ª Planta Norte, Tel: 913303819).

CONSENTIMIENTO PARA LA DONACIÓN DE MUESTRAS AL BIOBANCO
Yo, (nombre y Apellidos)..... con DNI .....
Manifiesto que he recibido la información adecuada sobre la <b>donación de la muestra al Biobanco del Hospital Clínico San Carlos</b> para su conservación y utilización en proyectos de investigación relacionados con mi enfermedad y que he podido formular las preguntas que he considerado oportunas. Por ello doy mi consentimiento para la donación de la muestra.
Observaciones o restricciones al uso de la muestra o a la posible comunicación de resultados..... .....
Fecha y Firma:

Nombre y firma del médico que proporciona la información: .....

*Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina*

**SE LE PROPORCIONARÁ UNA COPIA DE ESTE DOCUMENTO SI LO SOLICITA**

*Versión Febrero 2012*

## APÉNDICE 2: Informe Comité Ético de Investigación Clínica.



Hospital Clínico San Carlos



### Informe Dictamen Favorable Proyecto Investigación Biomédica

C.P. - C.I. 13/299-E

02 de septiembre de 2013

CEIC Hospital Clínico San Carlos

### INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Dra. Mar García Arenillas  
Secretaria del CEIC Hospital Clínico San Carlos

### CERTIFICA

Que el proyecto de investigación titulado "**Valoración del estado nutricional en enfermos con infección crónica por el virus de la hepatitis C y de su relación con el estadio evolutivo de la enfermedad**" con código interno nº 13/299-E del que es doctoranda **Dña Beatriz Mateos Muñoz** y directores de la tesis; Dr. José M<sup>a</sup> Ladero y Dr. Enrique Rey del Hospital Clínico San Carlos, ha sido estudiado por este Comité, no habiéndose realizado objeción alguna al mismo.

Es por ello que el Comité **informa favorablemente** sobre la realización de dicha tesis.

Lo que firmo en Madrid, a 02 de septiembre de 2013

Hospital Clínico  
San Carlos  
Comité Ético de  
Investigación Clínica

Dra. Mar García Arenillas  
Secretaria del CEIC Hospital Clínico San Carlos

### APÉNDICE 3: Resultados no significativos.

Tabla A1: Relación entre parámetros de composición corporal y estadio de la enfermedad catalogada como fibrosis leve-moderada (F0-F2) y avanzada (F3-F4).

	<u>F0 - F2</u>		<u>F3 – F4</u>		<b>P</b>
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>IMC</b>	24,15	22,62-28,2	27,05	24,5-29	<b>0,043</b>
<b>Grasa</b>	30,2	25,1-42,2	28,5	23,1-39,5	0,605
<b>Músculo</b>	69,8	57,8-74,9	71,5	60,4-76,8	0,605
<b>Magra</b>	8,55	6,22-13,5	11,5	8-16,2	0,092
<b>Agua total</b>	54,85	51,2-57,3	53,2	24,3-30,8	0,532
<b>Agua IC</b>	28,55	24,3-30,8	30,3	24,8-33	0,288
<b>Agua EC</b>	24,2	22,3-26,8	23,1	22,05-25,35	0,264

Agua IC: agua intracelular. Agua EC: agua extracelular. RIQ: rango intercuartílico. p: Significación estadística.

Tabla A2: Datos antropométricos para los diferentes polimorfismos de la *IL28B*.

	<u>CC</u>		<u>Portador alelo T</u>		<b>P</b>
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>IMC</b>	27,65	25,6-31,4	25,7	22,7-28,7	<b>0,043</b>
<b>Grasa</b>	25,25	23,2-45,7	30,15	24,8-39,9	0,526
<b>Músculo</b>	74,75	54,3-76,8	69,85	60,1-75,2	0,526
<b>Magra</b>	12,65	8,75-17,67	9,55	7,52-13,75	0,076
<b>Agua tot</b>	54,1	41,57-57,45	53,65	51,22-56,67	0,673
<b>Agua IC</b>	29,4	24,05-33,17	28,8	25-31,85	0,901
<b>Agua EC</b>	22,8	19,95-24,05	23,95	22,1-26,75	<b>0,040</b>

RIQ: rango intercuartílico. Agua tot: agua total. Agua IC: agua intracelular. Agua EC: agua extracelular. p: Significación estadística.



**Tabla A3:** Parámetros de composición corporal en relación con la presencia de esteatosis hepática.

	<u>No esteatosis</u>		<u>Esteatosis hepática</u>		<b>P</b>
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>IMC</b>	25,7	22,8-28,6	27,5	24,1-30	0,112
<b>Grasa</b>	28,45	23-39,5	30,1	25,3-45	0,141
<b>Músculo</b>	71,55	60,5-76,9	69,9	54,9-74,6	0,141
<b>Magra</b>	11	7,5-15,1	10	7,6-14,3	0,704
<b>Agua total</b>	54,5	49,2-57,5	53,2	44,4-55	0,205
<b>Agua IC</b>	29,2	24,6-32,1	28,6	24,1-31,1	0,432
<b>Agua EC</b>	23,6	22,1-26,7	23,8	21,7-25,3	0,740

RIQ: rango intercuartílico. Agua IC: agua intracelular. Agua EC: agua extracelular. p: Significación estadística.

**Tabla A4:** Datos antropométricos para los diferentes polimorfismos de *PNPLA3*.

	<u>CC</u>		<u>Portador G</u>		<b>P</b>
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>IMC</b>	26,85	23,4-32	25,8	23-27,7	0,377
<b>Grasa</b>	28	24,1-42,2	30,15	23,3-39,4	0,674
<b>Músculo</b>	72	57,8-75,8	69,85	60,5-76,6	0,674
<b>Magra</b>	11,75	7,82-16,2	9,55	7,2-12,7	0,127
<b>Agua total</b>	53,65	49,2-55,9	54,1	48,1-58,2	0,895
<b>Agua IC</b>	29,8	24,5-32,1	28,65	24,4-31,5	0,573
<b>Agua EC</b>	23,2	22-26,1	24	22,1-26,6	0,664

RIQ: rango intercuartílico. Agua IC: agua intracelular. Agua EC: agua extracelular. p: Significación estadística.

**Tabla A5:** Datos bioquímicos nutricionales para los diferentes genotipos de la *IL28B*.

	<u>CC</u>		<u>Portador alelo T</u>		<b>P</b>
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>Albúmina</b>	4,4	4,12-4,6	4,3	4-4,5	0,175
<b>Colesterol</b>	270,5	155,2-208,5	178	156-193	0,985
<b>Prealbúmina</b>	19,9	16,5-26,1	20,4	16,8-24,3	0,795

p: Significación estadística.



**Tabla A6:** Datos bioquímicos nutricionales según la presencia de esteatosis.

	<u>No esteatosis</u>		<u>Esteatosis</u>		<b>P</b>
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>Albúmina</b>	4,3	4-4,5	4,3	4,1-4,45	0,756
<b>Colesterol</b>	174,5	155-194,7	178	149-202,5	0,971
<b>Prealbúmina</b>	20,1	16,55-22,9	19,1	16-25,3	0,929

p: Significación estadística.

**Tabla A7:** Datos bioquímicos para los diferentes genotipos de *PNPLA3*.

	<u>CC</u>		<u>Portador alelo G</u>		<b>P</b>
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>Albúmina</b>	4,3	4,1-4,5	4,3	3,9-4,52	0,454
<b>Colesterol</b>	188	156-202	168	147-190	0,065
<b>Prealbúmina</b>	20,7	17,3-25,2	19	14,7-22,2	0,085

p: Significación estadística.

**Tabla A8:** Datos bioquímicos y la presencia de RI.

	<u>No RI</u>		<u>RI</u>		<b>P</b>
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>Albúmina</b>	4,3	4,1-4,5	4,2	3,9-4,5	0,160
<b>Colesterol</b>	180	156-207,5	168	153-192	0,366
<b>Prealbúmina</b>	20	17,2-24,3	20,25	15-24,6	0,672

p: Significación estadística.

**Tabla A9:** Oligoelementos y presencia de EH.

	<u>No EH</u>		<u>EH</u>		<b>P</b>
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>Se</b>	83,5	74-92,2	82	74-93	0,907
<b>Cu</b>	114	98-124,5	122	109-133	0,274
<b>Zn</b>	80	71,7-87	77,5	72-83	0,410

p: Significación estadística.

**Tabla A10:** Valores de oligoelementos en los diferentes genotipos *PNPLA3*.

	<u>CC</u>		<u>Portador alelo G</u>		P
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>Se</b>	82	75-91,7	84,5	74-93,5	0,966
<b>Cu</b>	114	102,2-123,7	122,5	106,2-128	0,289
<b>Zn</b>	78	69,7-87	82	71,7-84,5	0,979

p: Significación estadística.

**Tabla A11:** Relación entre vitamina A, RBP4 y cociente A/RBP4 y el estadio de la enfermedad catalogada como fibrosis leve-moderada (F0-F2) y avanzada (F3-F4).

	<u>F0 - F2</u>		<u>F3 – F4</u>		P
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>Vitamina A</b>	0,37	0,3-0,44	0,34	0,26-0,42	0,092
<b>RBP4</b>	3,6	2,9-4,6	3,2	2,4-4,1	0,117
<b>Cociente A/RBP4</b>	0,75	0,67-0,81	0,73	0,67-0,82	0,763

p: Significación estadística.

**Tabla A12:** Vitamina A, RBP4 y cociente A/RBP4 para los diferentes genotipos de la *IL28B*.

	<u>CC</u>		<u>Portador alelo T</u>		P
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>Vitamina A</b>	0,3	0,27-0,38	0,37	0,3-0,45	<b>0,028</b>
<b>RBP4</b>	3,2	2,47-3,87	3,6	2,8-4,4	0,082
<b>Cociente A/RBP4</b>	0,72	0,69-0,8	0,75	0,67-0,83	0,722

p: Significación estadística.

Tabla A13: Vitamina A, RBP4 y cociente A/RBP4 con y sin EH.

	<u>No EH</u>		<u>EH</u>		P
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>Vitamina A</b>	0,35	0,27-0,42	0,37	0,31-0,46	0,169
<b>RBP4</b>	3,3	2,7-4,1	3,7	3,2-4,2	0,136
<b>Cociente A/RBP4</b>	0,74	0,67-0,83	0,72	0,62-0,79	0,295

p: Significación estadística.

Tabla A14: Vitamina A, RBP4 y cociente A/RBP4 para los diferentes genotipos de *PNPLA3*.

	<u>CC</u>		<u>Portador alelo G</u>		P
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>Vitamina A</b>	0,36	0,27-0,42	0,37	0,31-0,46	0,227
<b>RBP4</b>	3,5	2,7-4,1	3,7	3,2-4,2	0,078
<b>Coc. A/RBP4</b>	0,74	0,67-0,83	0,72	0,62-0,79	0,717

Coc A/RBP4: cociente vitamina A/RBP4. p: Significación estadística.

Tabla A15: Coeficientes de correlación de la vitamina D con IL6 y LBP.

	<u>Vitamina D</u>	
	r (Spearman)	P
<b>LBP</b>	0,006	0,958
<b>IL6</b>	0,03	0,800

p: Significación estadística.

Tabla A16: Relación entre vitamina D y el estadio de la enfermedad catalogada como fibrosis leve-moderada (F0-F2) y avanzada (F3-F4).

	<u>F0 - F2</u>		<u>F3 - F4</u>		P
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>Vitamina D</b>	21,2	16,1-30,8	22,2	14,8-30,9	0,929

p: Significación estadística.

**Tabla A17:** Vitamina D para los diferentes genotipos de la *IL28B*.

	<u>CC</u>		<u>Portador alelo T</u>		<b>P</b>
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>Vitamina D</b>	18,3	14,1-24,8	24,1	17,7-31,5	0,075

p: Significación estadística.

**Tabla A18:** Valores de vitamina D según la presencia de esteatosis.

	<u>No esteatosis</u>		<u>Esteatosis</u>		<b>P</b>
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>Vitamina D</b>	22,8	17,6-31,1	19,2	12,9-25	0,079

p: Significación estadística.

**Tabla A19:** Vitamina D para los diferentes genotipos de la *PNPLA3*.

	<u>CC</u>		<u>CG</u>		<b>P</b>
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>Vitamina D</b>	23,85	18,2-31,2	21,55	14-29,6	0,185

p: Significación estadística.

**Tabla A20:** Valores de vitamina D según la presencia de RI.

	<u>No RI</u>		<u>RI</u>		<b>P</b>
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>Vitamina D</b>	24,1	15,7-31,4	21,05	14,9-29,4	0,242

p: Significación estadística.

**Tabla A21:** Valores de vitamina D para los diferentes fenotipos DBP.

Fenotipo DBP	Vitamina D		
	Mediana	IQR	P
<b>Gc1S/Gc1S</b>	23,8	17,9-31,4	
<b>Gc1S/Gc1F</b>	27,6	17,8-33,85	0,616
<b>Gc1S/Gc2</b>	21,05	14,27-27,2	0,196
<b>Gc2/Gc2</b>	21,7	n.e.	0,548
<b>Otros</b>	19,85	11,95-29,75	0,281
<b>Todos no Gc1S/Gc1S</b>	21,8	14,4-30,1	0,342

n.e.: no estimable.p: Significación estadística.

**Tabla A22:** Valores de LBP e IL6 para los diferentes genotipos de la *IL28B*.

	<u>CC</u>		<u>Portador alelo T</u>		P
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>LBP</b>	7,17	5,67-8,24	7,39	5,67-9,07	0,451
<b>IL6</b>	5,14	2,93-5,62	3,3	2,36-5,61	0,287

p: Significación estadística.

**Tabla A23:** LBP e IL6 para los diferentes genotipos de la *PNPLA3*.

	<u>CC</u>		<u>CG</u>		P
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
<b>LBP</b>	7,27	5,67-8,43	7,80	5,63-9,56	0,851
<b>IL6</b>	3,37	2,79-5,41	3,68	1,95-6,15	0,719

p: Significación estadística.

Tabla A24: Valores bioquímicos y la presencia de esteatosis hepática.

	<u>No EH</u>		<u>EH</u>		P
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
Hemoglobina	15,1	14,1-15,6	14,86	13,9-16,1	0,928
Leucocitos	5900	4600-6925	6100	4375-7200	0,645
Plaquetas	172000	130500-222000	197000	134000-241000	0,224
INR	0,9	0,8-0,9	0,88	0,8-0,9	0,311
Fibrinógeno	314	272-384	349	321-401	0,164
Ferritina	137,3	81,2-275	193	86,2-403	0,281
Ácido Fólico	8,76	6,38-12	8,22	5,59-13,2	0,523
Vitamina B12	429,2	279-512	455	321-573	0,207
Proteínas	7,2	7-7,4	7,5	7,1-7,8	0,106
Albúmina	4,2	4-4,5	4,3	4,12-4,47	0,756
Glucosa	96	87,5-104,5	99	94,5-106	0,120
Urea	30,5	25,25-37	32	26,2-36,7	0,794
Creatinina	0,87	0,8-0,98	0,91	0,83-1	0,428
Cistatina C	0,92	0,77-1,05	0,97	0,93-1,03	0,076
Ácido Úrico	5,25	4,42-6,07	5,4	4,67-6,7	0,08
LDH	398	347-439	408	359-441	0,762
ALT	62,5	44,2-102,7	78	50-91,7	0,324
AST	53,5	38-101	61	41,25-78,75	0,513
ALT/AST	0,87	0,69-1,05	0,78	0,66-0,91	0,306
GGT	47	33,7-89	88	55-163	<b>0,010</b>
Fosfatasa Alc	80,5	62,5-90	94	62-118	0,097
Bilirrubina	0,8	0,6-1,1	0,7	0,5-0,8	0,503
Colesterol	172	154,2-191	178	137-198	0,971
HDL	57	42-64,7	55	46-68	0,509
LDL	97,5	80,7-117	94	71-119	0,799
Triglicéridos	83,5	72,2-98	143	67-165	0,101
Calcio	9,5	9,3-9,7	9,6	9,4-9,9	0,362
T3L	3,17	2,95-3,45	3,07	2,87-3,39	0,6

Fosfatasa alc: fosfatasa alcalina. RIQ: rango intercuartílico. p: Significación estadística.

**Tabla A25:** Tabla resumen de variables que presentaron diferencias significativas respecto a la existencia de RI en análisis el univariado.

Variable	P
IMC	<0,001
Grasa corporal	0,037
Músculo	0,037
Agua total	<0,001
Agua extracelular	<0,001
Zinc	0,041
Cociente A/RBP4	<0,001
Fenotipo DBP	0,031
IL6	0,001
LBP	0,011
Esteatosis hepática	0,013
Fibrosis	<0,001
Cistatina C	<0,001
Ácido úrico	<0,001
ALT	0,042
AST	0,013
GGT	0,006
Triglicéridos	0,014
TSH	0,030
Bilirrubina total	0,029
Fenotipo Gc (Gc1-Gc1 vs resto)	0,031

p: Significación estadística.

**Tabla A26:** Tabla resumen de variables que presentaron diferencias significativas respecto a la existencia de fibrosis leve-moderada frente a fibrosis avanzada-severa en el análisis univariado.

Variable	P
Sexo	0,016
Portador alelo G <i>PNPLA3</i>	0,004
IL6	0,001
IMC	0,043
Se	0,031
Zn	0,003
Plaquetas	<0,007
INR	0,003
Vitamina B12	0,035
Albúmina	0,008
Cistatina C	0,001
Ácido Úrico	0,002
ALT	0,001
AST	<0,001
GGT	0,001
Fosfatasa alcalina	0,015
Bilirrubina	0,043
Colesterol	0,027
HDL	0,010
Triglicéridos	0,038
TSH	0,011

p: Significación estadística.





## **VIII.- BIBLIOGRAFÍA**



## VIII.- BIBLIOGRAFÍA:

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989;244(4902):359–62.
2. Robertson B, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, *et al.* Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Arch Virol*. 1998;143(12):2493–503.
3. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky J-M. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*. 2004;39(1):5–19.
4. Reed KE, Rice CM. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000;242:55–84.
5. McLauchlan J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat*. 2000;7(1):2–14.
6. Lohmann V, Roos A, Körner F, Koch JO, Bartenschlager R. Biochemical and structural analysis of the NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. *J Viral Hepat*. 2000;7(3):167–74.
7. Koutsoudakis G, Fornis X, Pérez-del-Pulgar S. Biología molecular aplicada del virus de la hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol*. 2013;36(4):280–93.
8. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, *et al.* Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment Web resource. *Hepatology*. 2014;59(1):318–27.
9. Pawlotsky J-M. Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clin Liver Dis*. 2003;7(1):45–66.
10. Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC, *et al.* The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science*. 2000;288(5464):339–44.
11. André P, Perlemuter G, Budkowska A, Bréchot C, Lotteau V. Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. *Semin Liver Dis*. 2005;25(1):93–104.
12. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang Q-X. Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(22):12766–71.
13. Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, Thumann C, Fofana I, Zona L, *et al.* EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med*. 2011;17(5):589–95.
14. Meertens L, Bertaux C, Dragic T. Hepatitis C Virus Entry Requires a Critical Postinternalization Step and Delivery to Early Endosomes via Clathrin-Coated Vesicles. *J Virol*. 2006;80(23):11571–8.

15. Miyanari Y, Hijikata M, Yamaji M, Hosaka M, Takahashi H, Shimotohno K. Hepatitis C virus non-structural proteins in the probable membranous compartment function in viral genome replication. *J Biol Chem*. 2003;278(50):50301–8.
16. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, *et al*. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol*. 2007;9(9):1089–97.
17. Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(2):107–15.
18. Guerra J, Garenne M, Mohamed MK, Fontanet A. HCV burden of infection in Egypt: results from a nationwide survey. *J Viral Hepat*. 2012;19(8):560–7.
19. Rantala M, van de Laar MJW. Surveillance and epidemiology of hepatitis B and C in Europe - a review. *Euro Surveill*. 2008;13(21).
20. Solà R, Cruz De Castro E, Hombrados M, Planas R, Coll S, Jardí R, *et al*. Prevalence of hepatitis B and hepatitis C viruses in different counties of Catalonia, Spain: cross-sectional study. *Med Clin (Barc)*. 2002;119(3):90–5.
21. Cornberg M, Razavi HA, Alberti A, Bernasconi E, Buti M, Cooper C, *et al*. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. *Liver Int*. 2011;31(s2):30–60.
22. Esteban JI, Sauleda S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol*. 2008;48(1):148–62.
23. Orland JR, Wright TL, Cooper S. Acute hepatitis C. *Hepatology*. 2001;33(2):321–7.
24. Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36(5 Suppl 1):S21–9.
25. Micallef JM, Kaldor JM, Dore GJ. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *J Viral Hepat*. 2006;13(1):34–41.
26. Freeman AJ, Dore GJ, Law MG, Thorpe M, Von Overbeck J, Lloyd AR, *et al*. Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2001;34(4 Pt 1):809–16.
27. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet*. 1997;349(9055):825–32.
28. Grebely J, Dore GJ. What is killing people with hepatitis C virus infection? *Semin Liver Dis*. 2011;31(4):331–9.
29. Hu KQ, Tong MJ. The long-term outcomes of patients with compensated hepatitis C virus-related cirrhosis and history of parenteral exposure in the United States. *Hepatology*. 1999;29(4):1311–6.
30. Bochud P-Y, Cai T, Overbeck K, Bochud M, Dufour J-F, Müllhaupt B, *et al*. Genotype 3 is associated with accelerated fibrosis progression in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2009;51(4):655–66.

31. Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J, Albrecht J. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis c. *J Hepatol*. 2001;34(5):730–9.
32. Yano M, Kumada H, Kage M, Ikeda K, Shimamatsu K, Inoue O, *et al*. The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology*. 1996;23(6):1334–40.
33. Bissell DM. Sex and hepatic fibrosis. *Hepatology*. 1999 Mar;29(3):988–9.
34. Hézode C, Lonjon I, Roudot-Thoraval F, Mavrier J-P, Pawlotsky J-M, Zafrani ES, *et al*. Impact of smoking on histological liver lesions in chronic hepatitis C. *Gut*. 2003;52(1):126–9.
35. Soto B, Sánchez-Quijano A, Rodrigo L, del Olmo JA, García-Bengoechea M, Hernández-Quero J, *et al*. Human immunodeficiency virus infection modifies the natural history of chronic parenterally-acquired hepatitis C with an unusually rapid progression to cirrhosis. *J Hepatol*. 1997;26(1):1–5.
36. Mohamed A el S, al Karawi MA, Mesa GA. Dual infection with hepatitis C and B viruses: clinical and histological study in Saudi patients. *Hepatogastroenterology*. 1997;44(17):1404–6.
37. Fartoux L, Chazouillères O, Wendum D, Poupon R, Serfaty L. Impact of steatosis on progression of fibrosis in patients with mild hepatitis C. *Hepatology*. 2005;41(1):82–7.
38. Mehta SH, Brancati FL, Strathdee SA, Pankow JS, Netski D, Coresh J, *et al*. Hepatitis C virus infection and incident type 2 diabetes. *Hepatology*. 2003;38(1):50–6.
39. Pradat P, Alberti A, Poynard T, Esteban J-I, Weiland O, Marcellin P, *et al*. Predictive value of ALT levels for histologic findings in chronic hepatitis C: a European collaborative study. *Hepatology*. 2002;36(4 Pt 1):973–7.
40. Fujita N, Sugimoto R, Urawa N, Araki J, Mifuji R, Yamamoto M, *et al*. Hepatic iron accumulation is associated with disease progression and resistance to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22(11):1886–93.
41. Jacobson IM, Cacoub P, Dal Maso L, Harrison SA, Younossi ZM. Manifestations of Chronic Hepatitis C Virus Infection Beyond the Liver. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010;8(12):1017–29.
42. Germer JJ, Zein NN. Advances in the molecular diagnosis of hepatitis C and their clinical implications. *Mayo Clin Proc*. 2001;76(9):911–20.
43. Al Olaby RR, Azzazy HME. Hepatitis C virus RNA assays: current and emerging technologies and their clinical applications. *Expert Rev Mol Diagn*. 2011;11(1):53–64.
44. Halfon P, Trimoulet P, Bourliere M, Khiri H, de Ledinghen V, Couzigou P, *et al*. Hepatitis C Virus Genotyping Based on 5' Noncoding Sequence Analysis (Trugene). *J Clin Microbiol*. 2001;39(5):1771–3.
45. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, *et al*. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*. 2009;461(7265):798–801.

46. Stättermayer AF, Hofer H, Ferenci P. Association between IL28B polymorphism and treatment response in patients with genotype 4 chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2012;57(3):706–7.
47. Nouredin M, Wright EC, Alter H, Clark S, Thomas E, Chen R, *et al.* Association of IL28B Genotype with Fibrosis Progression and Clinical Outcomes in Patients with Chronic Hepatitis C: A Longitudinal Analysis. *Hepatology.* 2013;58(5):1548–57.
48. Li JH, Lao XQ, Tillmann HL, Rowell J, Patel K, Thompson A, *et al.* Interferon-lambda genotype and low serum low-density lipoprotein cholesterol levels in patients with chronic hepatitis C infection. *Hepatology.* 2010;51(6):1904–11.
49. Stättermayer AF, Rutter K, Beinhardt S, Scherzer T-M, Stadlmayr A, Hofer H, *et al.* Association of the IL28B genotype with insulin resistance in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2012;57(3):492–8.
50. Morgan MY. Aspectos nutricionales de las enfermedades hepatobiliares. En: Rodés J, Benhamou JP, Bircher J, McIntyre N, Rizzetto M. *Tratado de Hepatología Clínica.* Vol 2. 2ª ed. Barcelona: Masson; 2001. p. 2175–240.
51. Guglielmi FW, Panella C, Buda A, Budillon G, Caregaro L, Clerici C, *et al.* Nutritional state and energy balance in cirrhotic patients with or without hypermetabolism. Multicentre prospective study by the “Nutritional Problems in Gastroenterology” Section of the Italian Society of Gastroenterology (SIGE). *Dig Liver Dis.* 2005;37(9):681–8.
52. Ismail FW, Khan RA, Kamani L, Wadalawala AA, Shah HA, Hamid SS, *et al.* Nutritional status in patients with hepatitis C. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2012;22(3):139.
53. Rivera Irigoien R, Abilés J. Nutritional support in patients with liver cirrhosis. *Gastroenterol Hepatol.* 2012;35(8):594–601.
54. Merli M, Riggio O, Dally L. Does malnutrition affect survival in cirrhosis? PINC (Policentrica Italiana Nutrizione Cirrosi). *Hepatology.* 1996;23(5):1041–6.
55. Henkel AS, Buchman AL. Nutritional support in patients with chronic liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2006;3(4):202–9.
56. Esteller Pérez A, Cabré Gelada E, Peña Quintan L. Nutrición en las enfermedades hepatobiliares. En: Gil-Hernández A. *Tratado de Nutrición.* Vol 4. 2ª ed. Madrid: Panamericana; 2010. p. 721–66.
57. Campillo B, Paillaud E, Uzan I, Merlier I, Abdellaoui M, Perennec J, *et al.* Value of body mass index in the detection of severe malnutrition: influence of the pathology and changes in anthropometric parameters. *Clin Nutr.* 2004;23(4):551–9.
58. Figueiredo FA, Dickson ER, Pasha TM, Porayko MK, Therneau TM, Malinchoc M, *et al.* Utility of standard nutritional parameters in detecting body cell mass depletion in patients with end-stage liver disease. *Liver Transpl.* 2000;6(5):575–81.
59. Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD, Deurenberg P, Elia M, Gómez JM, *et al.* Bioelectrical impedance analysis--part I: review of principles and methods. *Clin Nutr.* 2004;23(5):1226–43.

60. Piccoli A, Nescolarde LD, Rosell J. Conventional and vectorial analysis of bioimpedance in clinical practice. *Nefrologia*. 2002;22(3):228–38.
61. Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD, Deurenberg P, Elia M, Manuel Gómez J, *et al*. Bioelectrical impedance analysis-part II: utilization in clinical practice. *Clin Nutr*. 2004;23(6):1430–53.
62. Plauth M, Cabré E, Riggio O, Assis-Camilo M, Pirlich M, Kondrup J, *et al*. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Liver disease. *Clin Nutr*. 2006;25(2):285–94.
63. Schloerb PR, Forster J, Delcore R, Kindscher JD. Bioelectrical impedance in the clinical evaluation of liver disease. *Am J Clin Nutr*. 1996;64(3):510S – 514S.
64. Cabré E, de León R, Planas R, Bertrán X, Domènech E, Gassull MA. Reliability of bioelectric impedance analysis as a method of nutritional monitoring in cirrhosis with ascites. *Gastroenterol Hepatol*. 1995;18(7):359–65.
65. Hara N, Iwasa M, Iwata K, Miyachi H, Tanaka H, Takeo M, *et al*. Value of the extracellular water ratio for assessment of cirrhotic patients with and without ascites. *Hepatol Res*. 2009;39(11):1072–9.
66. Vitturi N, Soattin M, De Stefano F, Vianello D, Zambon A, Plebani M, *et al*. Ultrasound, anthropometry and bioimpedance: a comparison in predicting fat deposition in non-alcoholic fatty liver disease. *Eat Weight Disord* [Internet]. 2014 [citado 28 Ago 2014]; Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s40519-014-0146-z>
67. Antaki F, French MM, Moonka DK, Gordon SC. Bioelectrical Impedance Analysis for the Evaluation of Hepatic Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis C Infection. *Dig Dis Sci*. 2008;53(7):1957–60.
68. Kahraman A, Hilsenbeck J, Nyga M, Ertle J, Wree A, Plauth M, *et al*. Bioelectrical impedance analysis in clinical practice: implications for hepatitis C therapy BIA and hepatitis C. *Virology*. 2010;7:191.
69. Piquet M-A, Ollivier I, Gloro R, Castel H, Tiengou L-E, Dao T. Nutritional indices in cirrhotic patients. *Nutrition*. 2006;22(2):216–7.
70. Longo DL, Loscalzo J. Keshan Disease, Selenium Deficiency, and the Selenoproteome. *N Engl J Med*. 2014;370(18):1756–60.
71. Brown KM, Arthur JR. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr*. 2001;4(2B):593–9.
72. Bellinger FP, Raman AV, Reeves MA, Berry MJ. Regulation and function of selenoproteins in human disease. *Biochem J*. 2009;422(1):11–22.
73. Burk RF, Early DS, Hill KE, Palmer IS, Boeglin ME. Plasma selenium in patients with cirrhosis. *Hepatology*. 1998;27(3):794–8.
74. Jain SK, Pemberton PW, Smith A, McMahon RFT, Burrows PC, Aboutwerat A, *et al*. Oxidative stress in chronic hepatitis C: not just a feature of late stage disease. *J Hepatol*. 2002;36(6):805–11.



75. Ko W-S, Guo C-H, Yeh M-S, Lin L-Y, Hsu G-SW, Chen P-C, *et al.* Blood micronutrient, oxidative stress, and viral load in patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol.* 2005;11(30):4697–702.
76. González-Reimers E, Martín-González MC, Alemán-Valls MR, de la Vega-Prieto MJ, Galindo-Martín L, Abreu-González P, *et al.* Relative and combined effects of chronic alcohol consumption and HCV infection on serum zinc, copper, and selenium. *Biol Trace Elem Res.* 2009;132(1-3):75–84.
77. McElwee MK, Song MO, Freedman JH. Copper activation of NF-kappaB signaling in HepG2 cells. *J Mol Biol.* 2009;393(5):1013–21.
78. Persichini T, Percario Z, Mazzon E, Colasanti M, Cuzzocrea S, Musci G. Copper activates the NF-kappaB pathway in vivo. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(9-10):1897–904.
79. Guo C-H, Chen P-C, Lin K-P, Shih M-Y, Ko W-S. Trace metal imbalance associated with oxidative stress and inflammatory status in anti-hepatitis C virus antibody positive subjects. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2012;33(2):288–96.
80. Mastoi AA. Metabolic investigations in patients with hepatitis B and C. *World J Gastroenterol.* 2010;16(5):603.
81. Grüngreiff K. Plasma concentrations of zinc, copper, interleukin-6 and interferon- $\gamma$ , and plasma dipeptidyl peptidase IV activity in chronic hepatitis C. *Mol Med Rep [Internet].* 2008 [citado 8 Dic 2014]. Disponible en: [http://www.spandidos-publications.com/mmr/article.jsp?article\\_id=mmr\\_2\\_1\\_63](http://www.spandidos-publications.com/mmr/article.jsp?article_id=mmr_2_1_63)
82. McClain CJ, Marsano L, Burk RF, Bacon B. Trace metals in liver disease. *Semin Liver Dis.* 1991;11(4):321–39.
83. Moriyama M, Matsumura H, Fukushima A, Ohkido K, Arakawa Y, Nirei K, *et al.* Clinical significance of evaluation of serum zinc concentrations in C-viral chronic liver disease. *Dig Dis Sci.* 2006;51(11):1967–77.
84. Stamoulis I, Kouraklis G, Theocharis S. Zinc and the liver: an active interaction. *Dig Dis Sci.* 2007;52(7):1595–612.
85. Riggio O, Merli M, Capocaccia L, Caschera M, Zullo A, Pinto G, *et al.* Zinc supplementation reduces blood ammonia and increases liver ornithine transcarbamylase activity in experimental cirrhosis. *Hepatology.* 1992;16(3):785–9.
86. Murakami Y, Koyabu T, Kawashima A, Kakibuchi N, Kawakami T, Takaguchi K, *et al.* Zinc supplementation prevents the increase of transaminase in chronic hepatitis C patients during combination therapy with pegylated interferon alpha-2b and ribavirin. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2007;53(3):213–8.
87. Himoto. Insulin resistance derived from zinc deficiency in non-diabetic patients with chronic hepatitis C. *Exp Ther Med [Internet].* 2010 [citado 8 Dic 2014]1(4). Disponible en: <http://www.spandidos-publications.com/etm/1/4/707>
88. Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, Smith JM. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc.* 1976;35(6):1332–8.

89. Yeum K-J, Russell RM. Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:483–504.
90. Li Y, Wongsiriroj N, Blaner WS. The multifaceted nature of retinoid transport and metabolism. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2014;3(3):126–39.
91. Wolf G. Identification of a membrane receptor for retinol-binding protein functioning in the cellular uptake of retinol. *Nutr Rev.* 2007;65(8 Pt 1):385–8.
92. Tsutsumi C, Okuno M, Tannous L, Piantedosi R, Allan M, Goodman DS, *et al.* Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes. *J Biol Chem.* 1992;267(3):1805–10.
93. Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res.* 2002;43(11):1773–808.
94. Peres W a. F, Chaves GV, Gonçalves JCS, Ramalho A, Coelho HSM. Vitamin A deficiency in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *Br J Nutr.* 2011;106(11):1724–31.
95. O’Byrne SM, Blaner WS. Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology. *J Lipid Res.* 2013;54(7):1731–43.
96. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2005;6(11):1045–56.
97. Bitetto D, Bortolotti N, Falletti E, Vescovo S, Fabris C, Fattovich G, *et al.* Vitamin A deficiency is associated with hepatitis C virus chronic infection and with unresponsiveness to interferon-based antiviral therapy. *Hepatology.* 2013;57(3):925–33.
98. Loguercio C, Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic Biol Med.* 2003;34(1):1–10.
99. Kotnik P, Fischer-Posovszky P, Wabitsch M. RBP4: a controversial adipokine. *Eur J Endocrinol.* 2011;165(5):703–11.
100. Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, *et al.* Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature.* 2005;436(7049):356–62.
101. Graham TE, Yang Q, Blüher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, *et al.* Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med.* 2006;354(24):2552–63.
102. Munkhtulga L, Nakayama K, Utsumi N, Yanagisawa Y, Gotoh T, Omi T, *et al.* Identification of a regulatory SNP in the retinol binding protein 4 gene associated with type 2 diabetes in Mongolia. *Hum Genet.* 2007;120(6):879–88.
103. Petta S, Cammà C, Di Marco V, Alessi N, Barbaria F, Cabibi D, *et al.* Retinol-binding protein 4: a new marker of virus-induced steatosis in patients infected with hepatitis c virus genotype 1. *Hepatology.* 2008;48(1):28–37.

104. Janke J, Engeli S, Boschmann M, Adams F, Böhnke J, Luft FC, et al. Retinol-Binding Protein 4 in Human Obesity. *Diabetes*. 2006;55(10):2805–10.
105. Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Catalán V, Ramírez B, Silva C, Rotellar F, *et al.* Serum retinol-binding protein 4 is not increased in obesity or obesity-associated type 2 diabetes mellitus, but is reduced after relevant reductions in body fat following gastric bypass. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008;69(2):208–15.
106. Romero-Gómez M. Insulin resistance and hepatitis C. *World J Gastroenterol*. 2006;12(44):7075–80.
107. Gutierrez JA, Parikh N, Branch AD. Classical and emerging roles of vitamin D in hepatitis C virus (HCV) infection. *Semin Liver Dis*. 2011;31(4):387–98.
108. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289(1):F8–28.
109. Cohen ML, Douvdevani A, Chaimovitz C, Shany S. Regulation of TNF- $\alpha$  by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in human macrophages from CAPD patients. *Kidney Int*. 2001;59(1):69–75.
110. Von Essen MR, Kongsbak M, Schjerling P, Olgaard K, Odum N, Geisler C. Vitamin D controls T cell antigen receptor signaling and activation of human T cells. *Nat Immunol*. 2010;11(4):344–9.
111. Chesney RW. Vitamin D and The Magic Mountain: the anti-infectious role of the vitamin. *J Pediatr*. 2010;156(5):698–703.
112. Arteh J, Narra S, Nair S. Prevalence of vitamin D deficiency in chronic liver disease. *Dig Dis Sci*. 2010;55(9):2624–8.
113. Fisher L, Fisher A. Vitamin D and parathyroid hormone in outpatients with noncholestatic chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5(4):513–20.
114. Lange CM, Bojunga J, Ramos-Lopez E, von Wagner M, Hassler A, Vermehren J, *et al.* Vitamin D deficiency and a CYP27B1-1260 promoter polymorphism are associated with chronic hepatitis C and poor response to interferon- $\alpha$  based therapy. *J Hepatol*. 2011;54(5):887–93.
115. Ladero JM, Torrejón MJ, Sánchez-Pobre P, Suárez A, Cuenca F, de la Orden V, *et al.* Vitamin D deficiency and vitamin D therapy in chronic hepatitis C. *Ann Hepatol*. 2013;12(2):199–204.
116. Engelman CD, Fingerlin TE, Langefeld CD, Hicks PJ, Rich SS, Wagenknecht LE, *et al.* Genetic and Environmental Determinants of 25-Hydroxyvitamin D and 1,25-Dihydroxyvitamin D Levels in Hispanic and African Americans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(9):3381–8.
117. Terrier B, Carrat F, Geri G, Pol S, Piroth L, Halfon P, *et al.* Low 25-OH vitamin D serum levels correlate with severe fibrosis in HIV-HCV co-infected patients with chronic hepatitis. *J Hepatol*. 2011;55(4):756–61.

118. Petta S, Cammà C, Scazzone C, Tripodo C, Di Marco V, Bono A, *et al.* Low vitamin D serum level is related to severe fibrosis and low responsiveness to interferon-based therapy in genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2010;51(4):1158–67.
119. Terrier B, Jehan F, Munteanu M, Geri G, Saadoun D, Sène D, *et al.* Low 25-hydroxyvitamin D serum levels correlate with the presence of extra-hepatic manifestations in chronic hepatitis C virus infection. *Br J Rheumatol*. 2012;51(11):2083–90.
120. George J, Ganesh HK, Acharya S, Bandgar TR, Shivane V, Karvat A, *et al.* Bone mineral density and disorders of mineral metabolism in chronic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2009;15(28):3516–22.
121. Masuda S, Okano T, Osawa K, Shinjo M, Suematsu T, Kobayashi T. Concentrations of vitamin D-binding protein and vitamin D metabolites in plasma of patients with liver cirrhosis. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1989;35(4):225–34.
122. Bitetto D, Fattovich G, Fabris C, Ceriani E, Falletti E, Fornasiere E, *et al.* Complementary role of vitamin D deficiency and the interleukin-28B rs12979860 C/T polymorphism in predicting antiviral response in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2011;53(4):1118–26.
123. Kitson MT, Dore GJ, George J, Button P, McCaughan GW, Crawford DHG, *et al.* Vitamin D status does not predict sustained virologic response or fibrosis stage in chronic hepatitis C genotype 1 infection. *J Hepatol*. 2013;58(3):467–72.
124. Petta S, Ferraro D, Cammà C, Cabibi D, Di Cristina A, Di Marco V, *et al.* Vitamin D levels and IL28B polymorphisms are related to rapid virological response to standard of care in genotype 1 chronic hepatitis C. *Antivir Ther*. 2012;17(5):823–31.
125. Abu-Mouch S, Fireman Z, Jarchovsky J, Zeina A-R, Assy N. Vitamin D supplementation improves sustained virologic response in chronic hepatitis C (genotype 1)-naïve patients. *World J Gastroenterol*. 2011;17(47):5184–90.
126. Nimer A, Mouch A. Vitamin D improves viral response in hepatitis C genotype 2-3 naïve patients. *World J Gastroenterol*. 2012;18(8):800–5.
127. Bitetto D, Fabris C, Fornasiere E, Pipan C, Fumolo E, Cussigh A, *et al.* Vitamin D supplementation improves response to antiviral treatment for recurrent hepatitis C. *Transpl Int*. 2011;24(1):43–50.
128. Esmat G, El Raziky M, Elsharkawy A, Sabry D, Hassany M, Ahmed A, *et al.* Impact of Vitamin D Supplementation on Sustained Virological Response in Chronic Hepatitis C Genotype 4 Patients Treated by Pegylated Interferon/Ribavirin. *J Interferon Cytokine Res*. 2014;35(1):49-54.
129. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, *et al.* Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(7):1911–30.
130. García-Martín E, Agúndez JAG, Maestro ML, Suárez A, Vidaurreta M, Martínez C, *et al.* Influence of Vitamin D-Related Gene Polymorphisms (CYP27B and VDR) on the Response to Interferon/Ribavirin Therapy in Chronic Hepatitis C. *PLoS ONE* 2013;8(9):e74764

131. Haddad JG, Hu YZ, Kowalski MA, Laramore C, Ray K, Robzyk P, *et al.* Identification of the sterol- and actin-binding domains of plasma vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Biochemistry (Mosc)*. 1992;31(31):7174–81.
132. Otterbein LR, Cosio C, Graceffa P, Dominguez R. Crystal structures of the vitamin D-binding protein and its complex with actin: structural basis of the actin-scavenger system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(12):8003–8.
133. Verboven C, Rabijs A, De Maeyer M, Van Baelen H, Bouillon R, De Ranter C. A structural basis for the unique binding features of the human vitamin D-binding protein. *Nat Struct Biol*. 2002;9(2):131–6.
134. Zhang J, Habiel DM, Ramadass M, Kew RR. Identification of two distinct cell binding sequences in the vitamin D binding protein. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1803(5):623–9.
135. Rahman AH, Branch AD. Vitamin D for your patients with chronic hepatitis C? *J Hepatol*. 2013;58(1):184–9.
136. Bikle DD, Gee E, Halloran B, Kowalski MA, Ryzen E, Haddad JG. Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986;63(4):954–9.
137. Song YH, Naumova AK, Liebhaber SA, Cooke NE. Physical and meiotic mapping of the region of human chromosome 4q11-q13 encompassing the vitamin D binding protein DBP/Gc-globulin and albumin multigene cluster. *Genome Res*. 1999;9(6):581–7.
138. Malik S, Fu L, Juras DJ, Karmali M, Wong BYL, Gozdzik A, *et al.* Common variants of the vitamin D binding protein gene and adverse health outcomes. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2013;50(1):1–22.
139. Powe CE, Evans MK, Wenger J, Zonderman AB, Berg AH, Nalls M, *et al.* Vitamin D–Binding Protein and Vitamin D Status of Black Americans and White Americans. *N Engl J Med*. 2013;369(21):1991–2000.
140. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, van Meurs JB, Berry D, *et al.* Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet*. 2010;376(9736):180–8.
141. Arnaud J, Constans J. Affinity differences for vitamin D metabolites associated with the genetic isoforms of the human serum carrier protein (DBP). *Hum Genet*. 1993;92(2):183–8.
142. Binder R, Kress A, Kan G, Herrmann K, Kirschfink M. Neutrophil priming by cytokines and vitamin D binding protein (Gc-globulin): impact on C5a-mediated chemotaxis, degranulation and respiratory burst. *Mol Immunol*. 1999;36(13-14):885–92.
143. Meier U, Gressner O, Lammert F, Gressner AM. Gc-Globulin: Roles in Response to Injury. *Clin Chem*. 2006;52(7):1247–53.
144. Shah AB, DiMartino SJ, Trujillo G, Kew RR. Selective inhibition of the C5a chemotactic cofactor function of the vitamin D binding protein by 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>. *Mol Immunol*. 2006;43(8):1109–15.

145. Ho A-S, Cheng C-C, Lee S-C, Liu M-L, Lee J-Y, Wang W-M, *et al.* Novel biomarkers predict liver fibrosis in hepatitis C patients: alpha 2 macroglobulin, vitamin D binding protein and apolipoprotein AI. *J Biomed Sci.* 2010;17(1):58.
146. Falletti E, Cmet S, Fabris C, Fattovich G, Cussigh A, Bitetto D, *et al.* Genetic polymorphisms of vitamin D pathway predict antiviral treatment outcome in slow responder naïve patients with chronic hepatitis C. *PloS One.* 2013;8(11):e80764.
147. Irshad M, Mankotia DS, Irshad K. An insight into the diagnosis and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2013;19(44):7896–909.
148. Golden-Mason L, Rosen HR. Natural killer cells: multifaceted players with key roles in hepatitis C immunity. *Immunol Rev.* 2013;255(1):68–81.
149. Liu HM, Gale M. Hepatitis C Virus Evasion from RIG-I-Dependent Hepatic Innate Immunity. *Gastroenterol Res Pract.* 2010; Article ID 548390.
150. Neumann-Haefelin C, Thimme R. Adaptive immune responses in hepatitis C virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;369:243–62.
151. Malta FM, Bruno FR, Carvalho KI, Nastri ACSS, Kalil J, Carrilho FJ, *et al.* HCV viremia drives an increment of CD86 expression by myeloid dendritic cells. *J Med Virol.* 2013;85(11):1919–24.
152. Samuel CE. Antiviral Actions of Interferons. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4):778–809.
153. Fahey S, Dempsey E, Long A. The role of chemokines in acute and chronic hepatitis C infection. *Cell Mol Immunol.* 2014;11(1):25–40.
154. Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, Han J-H, Hanson HL, Ghayeb J, *et al.* HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science.* 2003;302(5645):659–62.
155. Szabo G, Dolganiuc A. Subversion of plasmacytoid and myeloid dendritic cell functions in chronic HCV infection. *Immunobiology.* 2005;210(2-4):237–47.
156. Osna N, Silonova G, Vilgert N, Hagina E, Kuse V, Giedraitis V, *et al.* Chronic hepatitis C: T-helper1/T-helper2 imbalance could cause virus persistence in peripheral blood. *Scand J Clin Lab Invest.* 1997;57(8):703–10.
157. Sofian M, Aghakhani A, Farazi AA, Banifazl M, Eslamifar A, Rashidi N, *et al.* Serum Profile of T Helper 1 and T Helper 2 Cytokines in Hepatitis C Virus Infected Patients. *Hepat Mon [Internet].* 2012; 12(12):e6156
158. Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang K-M. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology* 2003;38(6):1437–48.
159. Schröder NWJ, Schumann RR. Non-LPS targets and actions of LPS binding protein (LBP). *J Endotoxin Res.* 2005;11(4):237–42.
160. Kitchens RL, Thompson PA. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. *J Endotoxin Res.* 2005;11(4):225–9.

161. Gioannini TL, Weiss JP. Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells. *Immunol Res*. 2007;39(1-3):249–60.
162. Abad-Fernández M, Vallejo A, Hernández-Novoa B, Díaz L, Gutiérrez C, Madrid N, *et al*. Correlation between different methods to measure microbial translocation and its association with immune activation in long-term suppressed HIV-1-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2013;64(2):149–53.
163. Schumann RR. Old and new findings on lipopolysaccharide-binding protein: a soluble pattern-recognition molecule. *Biochem Soc Trans*. 2011;39(4):989–93.
164. Gaeta GB, Perna P, Adinolfi LE, Utili R, Ruggiero G. Endotoxemia in a series of 104 patients with chronic liver diseases: prevalence and significance. *Digestion*. 1982;23(4):239–44.
165. Bode C, Kugler V, Bode JC. Endotoxemia in patients with alcoholic and non-alcoholic cirrhosis and in subjects with no evidence of chronic liver disease following acute alcohol excess. *J Hepatol*. 1987;4(1):8–14.
166. Harte AL, da Silva NF, Creely SJ, McGee KC, Billyard T, Youssef-Elabd EM, *et al*. Elevated endotoxin levels in non-alcoholic fatty liver disease. *J Inflamm (Lond)*. 2010;7:15.
167. Sandler NG, Koh C, Roque A, Eccleston JL, Siegel RB, DeMino M, *et al*. Host Response to Translocated Microbial Products Predicts Outcomes of Patients with HBV or HCV infection. *Gastroenterology*. 2011;141(4):1220–30.
168. Yin B, Yu M, Zeng Z, Tian GS. Examination and evaluation of lipopolysaccharide binding protein in serum of patients with chronic hepatitis, severe hepatitis. *Chin J Exp Clin Virol*. 2001;15(3):226–7.
169. Giannitrapani L, Soresi M, Balasus D, Licata A, Montalto G. Genetic association of interleukin-6 polymorphism (-174 G/C) with chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2013;19(16):2449–55.
170. Oliveira CPMS, Kappel CR, Siqueira ER, Lima VMR, Stefano JT, Michalczuk MT, *et al*. Effects of Hepatitis C virus on cardiovascular risk in infected patients: A comparative study. *Int J Cardiol*. 2013;164(2):221–6.
171. Spanakis NE, Garinis GA, Alexopoulos EC, Patrinos GP, Menounos PG, Sklavounou A, *et al*. Cytokine serum levels in patients with chronic HCV infection. *J Clin Lab Anal*. 2002;16(1):40–6.
172. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;280(5):E745–51.
173. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*. 2004;145(5):2273–82.
174. García-Galiano D, Sánchez-Garrido MA, Espejo I, Montero JL, Costán G, Marchal T, *et al*. IL-6 and IGF-1 are independent prognostic factors of liver steatosis and non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Obes Surg*. 2007;17(4):493–503.



175. Jonsson JR, Barrie HD, O'Rourke P, Clouston AD, Powell EE. Obesity and steatosis influence serum and hepatic inflammatory markers in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2008;48(1):80–7.
176. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, *et al*. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(5):1930–5.
177. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li Z-W, Long JM, *et al*. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med*. 2005;11(2):191–8.
178. Day CP. From fat to inflammation. *Gastroenterology*. 2006;130(1):207–10.
179. Dasarathy S, Dasarathy J, Khiyami A, Joseph R, Lopez R, McCullough AJ. Validity of real time ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis: a prospective study. *J Hepatol*. 2009;51(6):1061–7.
180. Hernaez R, Lazo M, Bonekamp S, Kamel I, Brancati FL, Guallar E, *et al*. Diagnostic Accuracy and Reliability of Ultrasonography for the Detection of Fatty Liver: A Meta-Analysis. *Hepatology*. 2011;54(3):1082–90.
181. Salueña I, Ortega L, Devesa MJ, López-Alonso G, Taxonera C, Díaz-Rubio M, *et al*. Utility of liver biopsy in the etiologic diagnosis of biochemical liver abnormalities of unknown cause. *Gastroenterol Hepatol*. 2007;30(6):325–30.
182. De Lédinghen V, Vergniol J, Foucher J, Merrouche W, le Bail B. Non-invasive diagnosis of liver steatosis using controlled attenuation parameter (CAP) and transient elastography. *Liver Int*. 2012;32(6):911–8.
183. Iwasaki M, Takada Y, Hayashi M, Minamiguchi S, Haga H, Maetani Y, *et al*. Noninvasive evaluation of graft steatosis in living donor liver transplantation. *Transplantation*. 2004;78(10):1501–5.
184. Thomsen C, Becker U, Winkler K, Christoffersen P, Jensen M, Henriksen O. Quantification of liver fat using magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Imaging*. 1994;12(3):487–95.
185. Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, *et al*. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;288(2):E462–8.
186. Lee J-H, Kim D, Kim HJ, Lee C-H, Yang JI, Kim W, *et al*. Hepatic steatosis index: a simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis*. 2010;42(7):503–8.
187. Poynard T, Ratzu V, Naveau S, Thabut D, Charlotte F, Messous D, *et al*. The diagnostic value of biomarkers (SteatoTest) for the prediction of liver steatosis. *Comp Hepatol*. 2005;4:10.
188. Asselah T, Rubbia-Brandt L, Marcellin P, Negro F. Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter? *Gut*. 2006;55(1):123–30.



189. Fujino T, Nakamuta M, Yada R, Aoyagi Y, Yasutake K, Kohjima M, *et al.* Expression profile of lipid metabolism-associated genes in hepatitis C virus-infected human liver. *Hepatol Res.* 2010;40(9):923–9.
190. Serfaty L, Andreani T, Giral P, Carbonell N, Chazouillères O, Poupon R. Hepatitis C virus induced hypobetalipoproteinemia: a possible mechanism for steatosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2001;34(3):428–34.
191. Cheng Y, Dharancy S, Malapel M, Desreumaux P. Hepatitis C virus infection down-regulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and carnitine palmitoyl acyl-CoA transferase 1A. *World J Gastroenterol.* 2005;11(48):7591–6.
192. Suzuki R, Moriishi K, Fukuda K, Shirakura M, Ishii K, Shoji I, *et al.* Proteasomal Turnover of Hepatitis C Virus Core Protein Is Regulated by Two Distinct Mechanisms: a Ubiquitin-Dependent Mechanism and a Ubiquitin-Independent but PA28?-Dependent Mechanism. *J Virol.* 2009;83(5):2389–92.
193. Hope RG, McLauchlan J. Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein. *J Gen Virol.* 2000;81(8):1913–25.
194. De Gottardi A, Pazienza V, Pugnale P, Bruttin F, Rubbia-Brandt L, Juge-Aubry CE, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma mRNA levels are reduced in chronic hepatitis C with steatosis and genotype 3 infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;23(1):107–14.
195. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, *et al.* Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet.* 2008;40(12):1461–5.
196. He S, McPhaul C, Li JZ, Garuti R, Kinch L, Grishin NV, *et al.* A Sequence Variation (I148M) in PNPLA3 Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease Disrupts Triglyceride Hydrolysis. *J Biol Chem.* 2010;285(9):6706–15.
197. Pirazzi C, Adiels M, Burza MA, Mancina RM, Levin M, Ståhlman M, *et al.* Patatin-like phospholipase domain-containing 3 (PNPLA3) I148M (rs738409) affects hepatic VLDL secretion in humans and in vitro. *J Hepatol.* 2012;57(6):1276–82.
198. Kumari M, Schoiswohl G, Chitraju C, Paar M, Cornaciu I, Rangrez AY, *et al.* Adiponutrin Functions as a Nutritionally Regulated Lysophosphatidic Acid Acyltransferase. *Cell Metab.* 2012;15(5):691–702.
199. Dongiovanni P. PNPLA3 I148M polymorphism and progressive liver disease. *World J Gastroenterol.* 2013;19(41):6969.
200. Cai T, Dufour J-F, Muellhaupt B, Gerlach T, Heim M, Moradpour D, *et al.* Viral genotype-specific role of PNPLA3, PPARG, MTTP, and IL28B in hepatitis C virus-associated steatosis. *J Hepatol.* 2011;55(3):529–35.
201. Valenti L, Rumi M, Galmozzi E, Aghemo A, Del Menico B, De Nicola S, *et al.* Patatin-like phospholipase domain-containing 3 I148M polymorphism, steatosis, and liver damage in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2011;53(3):791–9.

202. Müller T, Buch S, Berg T, Hampe J, Stickel F. Distinct, alcohol-modulated effects of PNPLA3 genotype on progression of chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2011;55(3):732–3.
203. Trépo E, Pradat P, Potthoff A, Momozawa Y, Quertinmont E, Gustot T, *et al*. Impact of patatin-like phospholipase-3 (rs738409 C>G) polymorphism on fibrosis progression and steatosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2011;54(1):60–9.
204. Ampuero J, Del Campo JA, Rojas L, García-Lozano JR, Solá R, Andrade R, *et al*. PNPLA3 rs738409 causes steatosis according to viral & IL28B genotypes in hepatitis C. *Ann Hepatol*. 2014;13(4):356–63.
205. Valenti L, Aghemo A, Stättermayer AF, Maggioni P, Nicola S, Motta BM, *et al*. Implications of PNPLA3 polymorphism in chronic hepatitis C patients receiving peginterferon plus ribavirin. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;35(12):1434–42.
206. Guyot E, Sutton A, Rufat P, Laguillier C, Mansouri A, Moreau R, *et al*. < i> PNPLA3</i> rs738409, hepatocellular carcinoma occurrence and risk model prediction in patients with cirrhosis. *J Hepatol*. 2013;58(2):312–8.
207. Nischalke HD, Berger C, Luda C, Berg T, Müller T, Grünhage F, *et al*. The PNPLA3 rs738409 148M/M Genotype Is a Risk Factor for Liver Cancer in Alcoholic Cirrhosis but Shows No or Weak Association in Hepatitis C Cirrhosis. Hoshida Y, editor. *PLoS ONE*. 2011;6(11):e27087.
208. Singal AG, Manjunath H, Yopp AC, Beg MS, Marrero JA, Gopal P, *et al*. The Effect of PNPLA3 on Fibrosis Progression and Development of Hepatocellular Carcinoma: A Meta-analysis. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2014 [citado 5 Jun 2014]; Disponible en: <http://www.nature.com/ajg/journal/vaop/ncurrent/full/ajg2013476a.html>
209. Powers AC. Diabetes mellitus. En: Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL. *Harrison Principios de Medicina Interna*. Vol 2. 16th ed. México: McGrawHill; 2005. p. 2372–97.
210. Sesti G. Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2006;20(4):665–79.
211. Roberts CK, Hevener AL, Barnard RJ. Metabolic Syndrome and Insulin Resistance: Underlying Causes and Modification by Exercise Training. *Compr Physiol*. 2013;3(1):1–58.
212. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:219–46.
213. Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes*. 2007;56(1):16–23.
214. Biswas SK, Mantovani A. Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell Metab*. 2012;15(4):432–7.
215. Moreno-Indias I, Cardona F, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI. Impact of the gut microbiota on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Front Microbiol* [Internet]. 2014[citado 10 Feb 2015];5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4010744/>

216. Orr JS, Puglisi MJ, Ellacott KJ, Lumeng CN, Wasserman DH, Hasty AH. Toll-like Receptor 4 Deficiency Promotes the Alternative Activation of Adipose Tissue Macrophages. *Diabetes*. 2012;61(11):2718–27.
217. Solinas G, Vilcu C, Neels JG, Bandyopadhyay GK, Luo J-L, Naugler W, *et al*. JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. *Cell Metab*. 2007;6(5):386–97.
218. Stephens JM, Pekala PH. Transcriptional repression of the GLUT4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Biol Chem*. 1991;266(32):21839–45.
219. Ruan H, Hachohen N, Golub TR, Van Parijs L, Lodish HF. Tumor necrosis factor- $\alpha$  suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor- $\kappa$ B activation by TNF- $\alpha$  is obligatory. *Diabetes*. 2002;51(5):1319–36.
220. Holland WL, Bikman BT, Wang L-P, Yuguang G, Sargent KM, Bulchand S, *et al*. Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(5):1858–70.
221. Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med*. 2012;18(3):363–74.
222. Randers E, Erlandsen EJ. Serum cystatin C as an endogenous marker of the renal function—a review. *Clin Chem Lab Med*. 1999;37(4):389–95.
223. Gerbes AL, Gülberg V, Bilzer M, Vogeser M. Evaluation of serum cystatin C concentration as a marker of renal function in patients with cirrhosis of the liver. *Gut*. 2002;50(1):106–10.
224. Cholongitas E, Shusang V, Marelli L, Nair D, Thomas M, Patch D, *et al*. Review article: renal function assessment in cirrhosis – difficulties and alternative measurements. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26(7):969–78.
225. Takeuchi M, Fukuda Y, Nakano I, Katano Y, Hayakawa T. Elevation of serum cystatin C concentrations in patients with chronic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001;13(8):951–5.
226. Chu S-C, Wang C-P, Chang Y-H, Hsieh Y-S, Yang S-F, Su J-M, *et al*. Increased cystatin C serum concentrations in patients with hepatic diseases of various severities. *Clin Chim Acta*. 2004;341(1-2):133–8.
227. Ladero JM, Cárdenas MC, Ortega L, González-Pino A, Cuenca F, Morales C, *et al*. Serum cystatin C: a non-invasive marker of liver fibrosis or of current liver fibrogenesis in chronic hepatitis C? *Ann Hepatol*. 2012;11(5):648–51.
228. Lee JG, Lee S, Kim YJ, Jin HK, Cho BM, Kim YJ, *et al*. Multiple biomarkers and their relative contributions to identifying metabolic syndrome. *Clin Chim Acta*. 2009;408(1-2):50–5.
229. Servais A, Giral P, Bernard M, Bruckert E, Deray G, Isnard Bagnis C. Is serum cystatin-C a reliable marker for metabolic syndrome? *Am J Med*. 2008;121(5):426–32.

230. Surendar J, Indulekha K, Aravindhan V, Ganesan A, Mohan V. Association of cystatin-C with metabolic syndrome in normal glucose-tolerant subjects (CURES-97). *Diabetes Technol Ther.* 2010;12(11):907–12.
231. Vigil L, Lopez M, Condés E, Varela M, Lorence D, Garcia-Carretero R, *et al.* Cystatin C is associated with the metabolic syndrome and other cardiovascular risk factors in a hypertensive population. *J Am Soc Hypertension.* 2009;3(3):201–9.
232. Magnusson M, Hedblad B, Engström G, Persson M, Nilsson P, Melander O. High levels of cystatin C predict the metabolic syndrome: the prospective Malmö Diet and Cancer Study. *J Intern Med.* 2013;274(2):192–9.
233. Ascaso JF, Pardo S, Real JT, Lorente RI, Priego A, Carmena R. Diagnosing insulin resistance by simple quantitative methods in subjects with normal glucose metabolism. *Diabetes Care.* 2003;26(12):3320–5.
234. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28(7):412–9.
235. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care.* 2004;27(6):1487–95.
236. Eslam M, Kawaguchi T, Del Campo JA, Sata M, Khattab MA-E, Romero-Gomez M. Use of HOMA-IR in hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2011;18(10):675–84.
237. Gayoso-Diz P, Otero-Gonzalez A, Rodriguez-Alvarez MX, Gude F, Cadarso-Suarez C, García F, *et al.* Insulin resistance index (HOMA-IR) levels in a general adult population: curves percentile by gender and age. The EPIRCE study. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;94(1):146–55.
238. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiú E, Calle-Pascual A, Carmena R, *et al.* Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia.* 2012;55(1):88–93.
239. Hui JM, Sud A, Farrell GC, Bandara P, Byth K, Kench JG, *et al.* Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression. *Gastroenterology.* 2003;125(6):1695–704.
240. He Y, Nakao H, Tan S-L, Polyak SJ, Neddermann P, Vijaysri S, *et al.* Subversion of cell signaling pathways by hepatitis C virus nonstructural 5A protein via interaction with Grb2 and P85 phosphatidylinositol 3-kinase. *J Virol.* 2002;76(18):9207–17.
241. Street A, Macdonald A, Crowder K, Harris M. The Hepatitis C virus NS5A protein activates a phosphoinositide 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem.* 2004;279(13):12232–41.
242. Bernsmeier C, Duong FHT, Christen V, Pugnale P, Negro F, Terracciano L, *et al.* Virus-induced over-expression of protein phosphatase 2A inhibits insulin signalling in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2008;49(3):429–40.

243. Mankouri J, Tedbury PR, Gretton S, Hughes ME, Griffin SDC, Dallas ML, *et al.* Enhanced hepatitis C virus genome replication and lipid accumulation mediated by inhibition of AMP-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(25):11549–54.
244. Kawaguchi T, Yoshida T, Harada M, Hisamoto T, Nagao Y, Ide T, *et al.* Hepatitis C Virus Down-Regulates Insulin Receptor Substrates 1 and 2 through Up-Regulation of Suppressor of Cytokine Signaling 3. *Am J Pathol.* 2004;165(5):1499–508.
245. Pazienza V, Clément S, Pugnale P, Conzelman S, Foti M, Mangia A, *et al.* The hepatitis C virus core protein of genotypes 3a and 1b downregulates insulin receptor substrate 1 through genotype-specific mechanisms. *Hepatology.* 2007;45(5):1164–71.
246. Okuda M, Li K, Beard MR, Showalter LA, Scholle F, Lemon SM, *et al.* Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology.* 2002;122(2):366–75.
247. Vidali M, Tripodi M-F, Ivaldi A, Zampino R, Occhino G, Restivo L, *et al.* Interplay between oxidative stress and hepatic steatosis in the progression of chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2008;48(3):399–406.
248. Xu J, Kim HT, Ma Y, Zhao L, Zhai L, Kokorina N, *et al.* Trauma and Hemorrhage-Induced Acute Hepatic Insulin Resistance: Dominant Role of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ? *Endocrinology.* 2008;149(5):2369–82.
249. Hung C-H, Lee C-M, Lu S-N. Hepatitis C virus-associated insulin resistance: pathogenic mechanisms and clinical implications. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011;9(5):525–33.
250. Cua IH, Hui JM, Kench JG, George J. Genotype-specific interactions of insulin resistance, steatosis, and fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2008;48(3):723–31.
251. Dai C-Y, Huang J-F, Hsieh M-Y, Hou N-J, Lin Z-Y, Chen S-C, *et al.* Insulin resistance predicts response to peginterferon-alpha/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol.* 2009;50(4):712–8.
252. Bortoletto G, Scribano L, Realdon S, Marcolongo M, Mirandola S, Franceschini L, *et al.* Hyperinsulinaemia reduces the 24-h virological response to PEG-interferon therapy in patients with chronic hepatitis C and insulin resistance. *J Viral Hepat.* 2010;17(7):475–80.
253. Romero-Gómez M, Del Mar Viloria M, Andrade RJ, Salmerón J, Diago M, Fernández-Rodríguez CM, *et al.* Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology.* 2005;128(3):636–41.
254. Petta S, Rosso C, Leung R, Abate ML, Booth D, Salomone F, *et al.* Effects of IL28B rs12979860 CC genotype on metabolic profile and sustained virologic response in patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013;11(3):311–7.
255. Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, McGlynn KA, El-Serag HB. Diabetes increases the risk of hepatocellular carcinoma in the United States: a population based case control study. *Gut.* 2005;54(4):533–9.

256. Hung C-H, Lee C-M, Wang J-H, Hu T-H, Chen C-H, Lin C-Y, *et al.* Impact of diabetes mellitus on incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients treated with interferon-based antiviral therapy. *Int J Cancer*. 2011;128(10):2344–52.
257. Hung C-H, Wang J-H, Hu T-H, Chen C-H, Chang K-C, Yen Y-H, *et al.* Insulin resistance is associated with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol*. 2010;16(18):2265–71.
258. Veldt BJ, Chen W, Heathcote EJ, Wedemeyer H, Reichen J, Hofmann WP, *et al.* Increased risk of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C cirrhosis and diabetes mellitus. *Hepatology*. 2008;47(6):1856–62.
259. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 2003;348(17):1625–38.
260. Le Roith D. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med*. 1997;336(9):633–40.
261. Nagao Y, Kawaguchi T, Tanaka K, Kumashiro R, Sata M. Extrahepatic manifestations and insulin resistance in an HCV hyperendemic area. *Int J Mol Med*. 2005;16(2):291–6.
262. Veldt BJ, Poterucha JJ, Watt KDS, Wiesner RH, Hay JE, Rosen CB, *et al.* Insulin Resistance, Serum Adipokines and Risk of Fibrosis Progression in Patients Transplanted for Hepatitis C. *Am J Transplant*. 2009;9(6):1406–13.
263. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:425–56.
264. Yamane D, McGivern DR, Masaki T, Lemon SM. Liver injury and disease pathogenesis in chronic hepatitis C. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;369:263–88.
265. Li Z, Oben JA, Yang S, Lin H, Stafford EA, Soloski MJ, *et al.* Norepinephrine regulates hepatic innate immune system in leptin-deficient mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2004;40(2):434–41.
266. Shi Z, Wakil AE, Rockey DC. Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(20):10663–8.
267. Viñas O, Bataller R, Sancho-Bru P, Ginès P, Berenguer C, Enrich C, *et al.* Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology*. 2003;38(4):919–29.
268. Brenner DA. Molecular Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2009;120:361–8.
269. Bataller R, Paik Y-H, Lindquist JN, Lemasters JJ, Brenner DA. Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology*. 2004;126(2):529–40.
270. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005;115(2):209–18.

271. Bedossa P, Carrat F. Liver biopsy: The best, not the gold standard. *J Hepatol.* 2009;50(1):1–3.
272. West J, Card TR. Reduced mortality rates following elective percutaneous liver biopsies. *Gastroenterology.* 2010;139(4):1230–7.
273. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, *et al.* Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology.* 1981;1(5):431–5.
274. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology.* 1996;24(2):289–93.
275. Bedossa P, Carrat F. Liver fibrosis: Screening is not staging. *J Hepatol.* 2009;50(6):1268–9.
276. Friedrich-Rust M, Ong M-F, Martens S, Sarrazin C, Bojunga J, Zeuzem S, *et al.* Performance of transient elastography for the staging of liver fibrosis: a meta-analysis. *Gastroenterology.* 2008;134(4):960–74.
277. Fraquelli M, Rigamonti C, Casazza G, Donato MF, Ronchi G, Conte D, *et al.* Etiology-related determinants of liver stiffness values in chronic viral hepatitis B or C. *J Hepatol.* 2011;54(4):621–8.
278. Castéra L, Foucher J, Bernard P-H, Carvalho F, Allaix D, Merrouche W, *et al.* Pitfalls of liver stiffness measurement: a 5-year prospective study of 13,369 examinations. *Hepatology.* 2010;51(3):828–35.
279. Castera L, Forns X, Alberti A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol.* 2008;48(5):835–47.
280. Castéra L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, *et al.* Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2005;128(2):343–50.
281. Baranova A, Lal P, Birerdinc A, Younossi ZM. Non-Invasive markers for hepatic fibrosis. *BMC Gastroenterol.* 2011;11:91.
282. Grigorescu M. Noninvasive biochemical markers of liver fibrosis. *J Gastrointest Liver Dis.* 2006;15(2):149–59.
283. Castera L. Noninvasive methods to assess liver disease in patients with hepatitis B or C. *Gastroenterology.* 2012;142(6):1293–302.
284. Agúndez JAG, Golka K, Martínez C, Selinski S, Blaszkewicz M, García-Martín E. Unraveling Ambiguous NAT2 Genotyping Data. *Clin Chem.* 2008;54(8):1390–4.
285. Witthöft T, Möller B, Wiedmann KH, Mauss S, Link R, Lohmeyer J, *et al.* Safety, tolerability and efficacy of peginterferon alpha-2a and ribavirin in chronic hepatitis C in clinical practice: The German Open Safety Trial. *J Viral Hepat.* 2007;14(11):788–96.



286. Qi L, Zhang C, van Dam RM, Hu FB. Interleukin-6 genetic variability and adiposity: associations in two prospective cohorts and systematic review in 26,944 individuals. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(9):3618–25.
287. Himoto T, Yoneyama H, Kurokohchi K, Inukai M, Masugata H, Goda F, *et al.* Selenium deficiency is associated with insulin resistance in patients with hepatitis C virus–related chronic liver disease. *Nutr Res.* 2011;31(11):829–35.
288. Yu MW, Horng IS, Hsu KH, Chiang YC, Liaw YF, Chen CJ. Plasma selenium levels and risk of hepatocellular carcinoma among men with chronic hepatitis virus infection. *Am J Epidemiol.* 1999;150(4):367–74.
289. Lin C-C, Huang J-F, Tsai L-Y, Huang Y-L. Selenium, iron, copper, and zinc levels and copper-to-zinc ratios in serum of patients at different stages of viral hepatic diseases. *Biol Trace Elem Res.* 2006;109(1):15–24.
290. Rohr-Udilova N, Sieghart W, Eferl R, Stoiber D, Björkhem-Bergman L, Eriksson LC, *et al.* Antagonistic effects of selenium and lipid peroxides on growth control in early hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2012;55(4):1112–21.
291. Himoto T, Nomura T, Tani J, Miyoshi H, Morishita A, Yoneyama H, *et al.* Exacerbation of Insulin Resistance and Hepatic Steatosis Deriving from Zinc Deficiency in Patients with HCV-Related Chronic Liver Disease. *Biol Trace Elem Res.* 2015;163(1-2):81–8.
292. Ladero JM, Ropero P, Ortega L, Taxonera C, González FA, López-Alonso G, *et al.* [HFE gene mutations, hepatic iron content, and histological severity in hepatitis C virus-induced chronic hepatitis]. *Rev Esp Enferm Dig.* 2003;95(12):829–36.
293. Ladero JM, López-Alonso G, Devesa MJ, Cuenca F, Ortega L, Agreda M, *et al.* Oscillations in serum ferritin associated with antiviral therapy in chronic hepatitis C. *Rev Esp Enferm Dig.* 2009;101(1):31–40.
294. Zanotti G, Berni R. Plasma retinol-binding protein: structure and interactions with retinol, retinoids, and transthyretin. *Vitam Horm.* 2004;69:271–95.
295. Qin S, Zhou Y, Lok AS, Tsodikov A, Yan X, Gray L, *et al.* SRM targeted proteomics in search for biomarkers of HCV-induced progression of fibrosis to cirrhosis in HALT-C patients. *Proteomics.* 2012;12(8):1244–52.
296. Huang J-F, Dai C-Y, Yu M-L, Shin S-J, Hsieh M-Y, Huang C-F, *et al.* Serum retinol-binding protein 4 is inversely correlated with disease severity of chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2009;50(3):471–8.
297. Kukla M, Berdowska A, Stygar D, Gabriel A, Mazur W, Łogiewa-Bazger B, *et al.* Serum FGF21 and RBP4 levels in patients with chronic hepatitis C. *Scand J Gastroenterol.* 2012;47(8-9):1037–47.
298. Iwasa M, Hara N, Miyachi H, Tanaka H, Takeo M, Fujita N, *et al.* Patients achieving clearance of HCV with interferon therapy recover from decreased retinol-binding protein 4 levels. *J Viral Hepat.* 2009;16(10):716–23.



299. Mourey MS, Siegenthaler G, Amédée-Manesme O. Regulation of metabolism of retinol-binding protein by vitamin A status in children with biliary atresia. *Am J Clin Nutr.* 1990;51(4):638–43.
300. Tanumihardjo SA. Vitamin A: biomarkers of nutrition for development. *Am J Clin Nutr.* 2011;94(2):658S – 65S.
301. Petta S, Grimaudo S, Marco VD, Scazzone C, Macaluso FS, Cammà C, *et al.* Association of vitamin D serum levels and its common genetic determinants, with severity of liver fibrosis in genotype 1 chronic hepatitis C patients. *J Viral Hepat.* 2013;20(7):486–93.
302. Szathmary EJ. The effect of Gc genotype on fasting insulin level in Dogrib Indians. *Hum Genet.* 1987;75(4):368–72.
303. Hirai M, Suzuki S, Hinokio Y, Hirai A, Chiba M, Akai H, *et al.* Variations in vitamin D-binding protein (group-specific component protein) are associated with fasting plasma insulin levels in Japanese with normal glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(5):1951–3.
304. Hirai M, Suzuki S, Hinokio Y, Chiba M, Kasuga S, Hirai A, *et al.* Group specific component protein genotype is associated with NIDDM in Japan. *Diabetologia.* 1998;41(6):742–3.
305. Baier LJ, Dobberfuhl AM, Pratley RE, Hanson RL, Bogardus C. Variations in the vitamin D-binding protein (Gc locus) are associated with oral glucose tolerance in nondiabetic Pima Indians. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(8):2993–6.
306. Iyengar S, Hamman RF, Marshall JA, Majumder PP, Ferrell RE. On the role of vitamin D binding globulin in glucose homeostasis: results from the San Luis Valley Diabetes Study. *Genet Epidemiol.* 1989;6(6):691–8.
307. Braun A, Bichlmaier R, Müller B, Cleve H. Molecular evaluation of an Alu repeat including a polymorphic variable poly(dA) (AluVpA) in the vitamin D binding protein (DBP) gene. *Hum Genet.* 1993;90(5):526–32.
308. Klupa T, Malecki M, Hanna L, Sieradzka J, Frey J, Warram JH, *et al.* Amino acid variants of the vitamin D-binding protein and risk of diabetes in white Americans of European origin. *Eur J Endocrinol.* 1999;141(5):490–3.
309. Ye WZ, Dubois-Laforgue D, Bellanné-Chantelot C, Timsit J, Velho G. Variations in the vitamin D-binding protein (Gc locus) and risk of type 2 diabetes mellitus in French Caucasians. *Metab Clin Exp.* 2001;50(3):366–9.
310. Malecki MT, Klupa T, Wanic K, Cyganek K, Frey J, Sieradzki J. Vitamin D binding protein gene and genetic susceptibility to type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Diabetes Res Clin Pract.* 2002;57(2):99–104.
311. Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis SA. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;93 Suppl 1:S52–9.
312. Dolganiuc A, Norkina O, Kodys K, Catalano D, Bakis G, Marshall C, *et al.* Viral and host factors induce macrophage activation and loss of toll-like receptor tolerance in chronic HCV infection. *Gastroenterology.* 2007;133(5):1627–36.

313. Hammerich L, Tacke F. Interleukins in chronic liver disease: lessons learned from experimental mouse models. *Clin Exp Gastroenterol*. 2014;7:297–306.
314. Hung C-H, Lee C-M, Chen C-H, Hu T-H, Jiang S-R, Wang J-H, *et al*. Association of inflammatory and anti-inflammatory cytokines with insulin resistance in chronic hepatitis C. *Liver Int*. 2009;29(7):1086–93.
315. López-Prieto J, González-Reimers E, Alemán-Valls MR, de la Vega-Prieto MJ, Abreu-González P, Pelazas-González R, *et al*. Iron and proinflammatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection. *Biol Trace Elem Res*. 2013;155(1):5–10.
316. Nakamura M, Kanda T, Nakamoto S, Miyamura T, Jiang X, Wu S, *et al*. No Correlation between PNPLA3 rs738409 Genotype and Fatty Liver and Hepatic Cirrhosis in Japanese Patients with HCV. Ray RB, editor. *PLoS ONE*. 2013;8(12):e81312.
317. Rüeger S, Bochud P-Y, Dufour J-F, Müllhaupt B, Semela D, Heim MH, *et al*. Impact of common risk factors of fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Gut*. 2014;11:doi: 10.1136
318. Negro F. Facts and fictions of HCV and comorbidities: steatosis, diabetes mellitus, and cardiovascular diseases. *J Hepatol*. 2014;61(1 Suppl):S69–78.
319. Pradhan AD. Sex differences in the metabolic syndrome: implications for cardiovascular health in women. *Clin Chem*. 2014;60(1):44–52.
320. Kalyani RR, Egan JM. Diabetes and altered glucose metabolism with aging. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2013;42(2):333–47.
321. Wolf G. Serum retinol-binding protein: a link between obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Nutr Rev*. 2007;65(5):251–6.
322. Huang C-F, Dai C-Y, Yeh M-L, Huang C-I, Tai C-M, Hsieh M-H, *et al*. Association of diabetes and PNPLA3 genetic variants with disease severity of patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2015;62(3):512–8.
323. Attallah AM, El-Far M, Abdel Malak CA, Omran MM, Farid K, Hussien MA, *et al*. Fibro-check: a combination of direct and indirect markers for liver fibrosis staging in chronic hepatitis C patients. *Ann Hepatol*. 2015;14(2):225–33.

